Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.A. Kühn

ANALYSE VON RENIN-SEKRETION UND PLASMA-RENIN-SUBSTRAT BEI AKUTEM BLUTVERLUST AN KANINCHEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Reinhard Koch

aus Weißenburg/Bayern

Würzburg, 26. April 1980

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.A. Kühn

ANALYSE VON RENIN-SEKRETION UND PLASMA-RENIN-SUBSTRAT BEI AKUTEM BLUTVERLUST AN KANINCHEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Reinhard Koch

aus Weißenburg/Bayern

Würzburg, 26. April 1980

Referent: Professor Dr. med. H. WERNZE

Korreferent: Professor Dr. med. H.A. KÜHN

Dekan: Professor Dr. med. K.-H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	METHODIK	4
	1. Durchführung der akuten hämorrhagischen Hypotension bei Kaninchen	4
	a. Tiermaterial und Gruppierung	4
	b. Experimentelles Vorgehen	4
	2. Herstellung eines reninarmen, angiotensinogenreichen Plasmas	7
	a. Chirurgisches Vorgehen	7
	b. Austestung des Nephrectomieplasmas	9
	c. Bestimmung der Substratkonzentration des Nephrectomieplasmas	9
	3. Gewinnung von Schweinerenin	9
	a. Herstellung der Reningharge	9
	b. Austestung der Reningharge auf Angiotensinasenfreiheit	12
	c. Austestung der Reningharge mit dem Nephrectomieplasma	13
	4. Radioimmunologische Bestimmung von PRA, PRC und PRSC	15
	a. PRSC-Bestimmung mit dem RIA	16
	b. Bestimmung der PRC	21
	c. Bestimmung der PRA	21
	d. Berechnung der Ergebnisse	22
	5. Bestimmung des Gesamteiweißes	25
	6. Hämatokrit-Bestimmung	25
	7. Blutdruckmessung	26
	8. Gewichtsbestimmung	26
	9. Statistische Berechnungen	26

Seite

III. ERGEBNISSE 27
1. Allgemeinzustand der Tiere 27
2. PRC vor und nach Hämorrhagie 28
3. PRSC vor und nach Hämorrhagie 30
4. PRA vor und nach Hämorrhagie in der Gruppe III 32
5. Gesamteiweiß vor und nach steigendem Blutentzug 33
6. Hämatokrit 35
7. Blutdruckwerte vor und nach Hämorrhagie in der Gruppe III 37

IV. DISKUSSION 38
Renin-Substrat, Renin und Hämorrhagie 38
Vergleich PRC- PRA 45

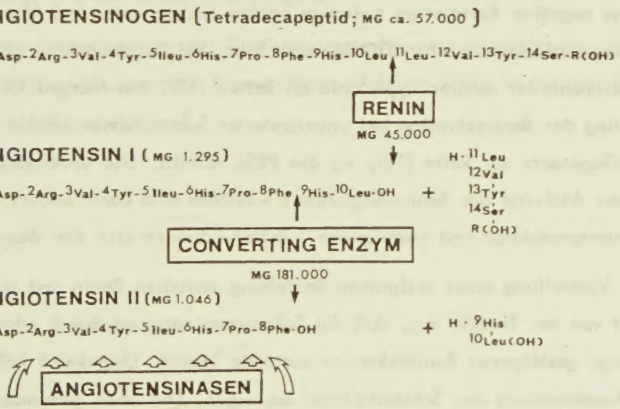
V. ZUSAMMENFASSUNG 47

VI. LITERATURVERZEICHNIS 48

I. EINLEITUNG

Die Aufrechterhaltung des Blutdrucks beruht auf dem Zusammenspiel verschiedenartiger Regulationssysteme. Von diesen besitzt das Renin-Angiotensin-System (RAS) einen wichtigen Einfluß über eine Tonuserhöhung der arteriellen Widerstandsgefäße und vermehrte Rückresorption von Natrium und Wasser aus dem Primärharn. Die einzelnen wirksamen Komponenten des Renin - Angiotensin - Systems (RAS) sind: 1. Renin, 2. Renin-Substrat (Angiotensinogen), 3. Converting Enzym und 4. Angiotensin II (Abb. 1).

Abb. 1: Schema der Substrat- und Enzymkomponenten des Renin-Angiotensin-Systems



Seit den Versuchen von HUIDEBRO und BRAUN-MENENDEZ (1942) ist bekannt, daß akute Blutverluste die Reninsekretion steigern. Dieser Befund wird von anderen Autoren wiederholt bestätigt (11, 18, 34, 42 62, 71). Hauptsächlicher Bildungs- und Sekretionsort von Renin ist der juxtaglomeruläre Apparat der Nierenrinde. Erwartungsgemäß bleibt der Reninanstieg bei Nephrectomie aus (42, 50, 61). Nachdem die Regulation der Reninfreisetzung vielfach untersucht worden ist, findet in

den letzten Jahren die des Renin-Substrates zunehmende Beachtung. Beim Menschen wurden kürzlich zwei Haupt- und fünf bis sechs Unterfraktionen von Angiotensinogen isoliert (41).

Die hepatische Biosynthese dieses Proteins steht außer Zweifel (46), das Molekulargewicht beim Kaninchen wird mit 57000 angegeben (55). Ein starker Anstieg der Plasma-Renin-Substratkonzentration (PRSC) findet sich nach bilateraler Nephrectomie an Hunden (15) und Ratten (13, 31, 32, 66). Im Gegensatz dazu fällt die PRSC nach bilateraler Adrenalectomie an Ratten auf einen niedrigen Spiegel ab (13, 31, 45, 66) und steigt durch die anschließende Entfernung beider Nieren wieder stark an (13). Das gegenläufige Verhalten von Renin und Renin-Substrat unter diesen Versuchsbedingungen sowie unter salzarmer Diät (13), führte zu der Vorstellung eines reziproken Verhältnisses zwischen Renin und Angiotensinogen.

Andere experimentelle Untersuchungen unterstützen diese Theorie nicht. So besteht keine negative Korrelation zwischen beiden Komponenten bei Überdosierung mit Desoxycorticosteronacetat (DOCA) und Salz, bei Salzbelastung alleine oder bei experimenteller renaler Hypertonie an Ratten (13). Na-Mangel führt zu einem Anstieg der Reninsekretion bei unveränderter Substratkonzentration an Schafen (8) im Gegensatz zur Ratte (13), wo die PRSC abfällt. Die unveränderte PRSC bei erhöhter Aktivität des Renin-Angiotensin - Systems wird damit erklärt, daß stimulierte Substratproduktion und gesteigerter Substratverbrauch sich die Waage halten.

Die Vorstellung einer reziproken Beziehung zwischen Renin und seinem Substrat geht von der Theorie aus, daß die Substrateriedrigung durch erhöhten Verbrauch infolge gesteigerter Reninsekretion zustande kommt. Umgekehrt läßt eine Reninsekretionshemmung den Substratspiegel ansteigen. Die oben genannten Ausnahmen machen zusätzliche Erklärungen notwendig. So wird heute angenommen, daß unabhängig vom Substratverbrauch auch die Biosynthese des Angiotensinogens in der Leber einer Feinsteuerung unterliegt, die von mehreren Faktoren abhängt. Als solche wurden erkannt: 1. Glucocorticoide, 2. Angiotensin II selbst, 3. ein Faktor von Proteinnatur (Gamma Globulin?), der bei urämischen Situationen auftritt (31).

Im Gegensatz zur Stimulierung der Reninsekretion sind Simultanbestimmungen von Renin und Renin-Substrat bei hämorrhagischen Zuständen selten (18, 3, 7). Während

die erste Arbeitsgruppe bei Hunden von einem Abfall der Substratwerte berichtet, bleibt bei letzteren an derselben Spezies die PRSC unverändert. Eine Deutung dieser Befunde ist zusätzlich erschwert, da die Ergebnisse von den Versuchsanordnungen her kaum vergleichbar sind. Gerade diese Bedingungen sind für die Beurteilung der Resultate wesentlich.

Um die Kenntnisse über das Verhalten von Renin-Substrat (RS) im Zusammenhang mit der Reninsekretion nach größeren Blutverlusten zu erweitern, wurden eigene Untersuchungen bei Kaninchen über sechs Tage mit folgender Fragestellung durchgeführt.

1. Kommt es zu Schwankungen der PRSC nach akuten Blutungen und wenn ja, welchen qualitativen Verlauf nimmt sie?

2. Besteht eine Beziehung zwischen der Größe des Volumenverlustes und den Veränderungen von PRC und PRSC? Für die PRC liegen solche Untersuchungen vor, für die PRSC sind uns keine Befunde bekannt.

3. Beeinflussen Veränderungen der Angiotensinogenkonzentration die von vielen Autoren diagnostisch benutzte Plasma-Renin-Aktivität (PRA) im Vergleich zur Plasma-Renin-Konzentration?

II. METHODIK

1. Durchführung der akuten hämorrhagischen Hypotension bei Kaninchen

a. Tiermaterial und Gruppierung

Für die Hämorrhagieversuche wurden 22 erwachsene, männliche und weibliche Kaninchen verwendet. Sie waren bei einer Raumtemperatur von 20°C einzeln in Laborkäfigen (Ruco Waalre, Holland) untergebracht. Ihr Gewicht lag vor Beginn des Versuches zwischen 2,640 kg und 4,200 kg. Die Tiere hatten mindestens drei Tage Zeit, um sich an die neuen Tierställe und an die veränderte Umgebung zu gewöhnen. Futter und Wasser stand ab libitum zur Verfügung. Als Trockenfutter diente Altromin- Kn^{+} 023 und zum Trinken normales Leitungswasser.

Die Kaninchen wurden in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I (n=9) Blutentnahme von 10,6 (10,0-11,1) ml/kg, entspricht einem ca. 20prozentigem Blutverlust

Gruppe II (n=6) Blutentnahme von 16,4 (14,9-16,7) ml/kg, entspricht einem ca. 30prozentigem Blutverlust

Gruppe III (n=7) Blutentnahme von 21,5 (20,6-22,7) ml/kg, entspricht einem ca. 40prozentigem Blutverlust.

Die Entnahmevolumina sind Annäherungswerte, die auf dem Gewicht der jeweiligen Tiere beruhen, weil eine relativ gute Beziehung zwischen Körpergewicht und Blutvolumen besteht. So wird das Gesamtblutvolumen der Europäischen Kaninchen mit 55,6 (44,0-70,0) ml/kg angegeben (21).

b. Experimentelles Vorgehen

Am Versuchstag wurden die Kaninchen zur Berechnung des Blutvolumens gewogen und in die modifizierte Pyrogentestbox für Kaninchen (Süsse und Schmidt KG, Kassel) gesetzt.

Zur Bestimmung der Basalwerte von Renin, Reninsubstrat und anderen Meßgrößen wurde aus der seitlichen Ohrvene 2-3 ml Blut unter Zusatz von einem Tropfen Heparin (Calciparin^{R}) entnommen. Zur Verhinderung der Gerinnung wurde die Spritze mehrmals geschwenkt und sofort in Eiswasser abgekühlt.

Den Kaninchen wurde jetzt 7500 I.E. Heparin langsam in die Ohrvene gespritzt. Nach kurzem Abwarten (zwei Min.), wurde das aus der Einstichstelle heraustropfende Blut aufgefangen.

Diese Methode erwies sich bei der Gruppe I und drei Kaninchen der Gruppe II vom Entnahmevolumen her als völlig ausreichend. Bei den restlichen Tieren der Gruppe II und der Gruppe III wurde, wegen der Größe des zu entnehmenden Blutvolumens, eine arterielle Hämorrhagie notwendig. Außerdem sollte die Blutentnahme in einem zeitlich definierten Rahmen ablaufen, was bei einer venösen Blutentnahme über den gesetzten Rahmen weit hinausgegangen wäre. Zu diesem Zweke kombinierten wir eine Einmalkanüle Nr. 1 mit einem Venenkatheter und einer Klemme, mit der wir die Blutentnahme bestens regulieren konnten. Die Kanüle wurde nach Desinfektion, Entnahme des Vorwertes, Heparinisierung wie beschrieben, in die Ohrarterie gelegt und mit Leukoplast befestigt, um eine Verschiebung zu vermeiden. Die Hämorrhagie wurde hier so geregelt, daß zur Zeit 0, 15 Min., 30 Min., 45 Min., 60 Min. und 75 Min. je 15 ml Vollblut entnommen wurden. Die Blutentnahme erfolgte bewußt protahiert, um nach Möglichkeit eine langdauernde "physiologische" Blutung zu imitieren. Wie stark trotzdem die Kreislaufbelastung für die Kaninchen war, zeigt der Tod von vier Tieren in der Gruppe III.

Die Entnahmedauer lag bei der Gruppe I ziemlich genau bei 30 Min., bei der Gruppe II zwischen 45 und 60 Min. und bei der Gruppe III zwischen 60 und 75 Min.

Die Unterschiede in den Blutentnahmezeiten für die einzelnen Gruppen erklären sich aus dem nach Gewicht berechneten Blutentnahmevolumina. Dadurch wurde eine gleichbleibende Entblutungsgeschwindigkeit in allen drei Gruppen zwischen 0,31 - 0,35 ml/kg/Min. erreicht. Die Hämorrhagieversuche fanden zwischen 10 Uhr und 14 Uhr statt.

Nach Abschluß der Entblutung wurde die Einstichstelle verbunden bzw. abgeklemmt, so lange das körpereigene Gerinnungssystem nicht funktionierte, damit die Tiere keinen zusätzlichen Blutverlust erlitten. Sie wurden dann in ihre Laborkäfige zurückgebracht.

Mit dem Ende der Hämorrhagie wurde die Zeit gestoppt und eine sechstagelange Kontrolle der Kaninchen mit zehn weiteren Blutentnahmen a 2 - 3 ml in den folgenden Zeitabständen durchgeführt.

1 Std.	nach Beendigung der Hämorrhagie
3 Std.	"
6 Std.	"
20 Std.	"
30 Std.	"
48 Std.	"
72 Std. (3 Tage)	"
96 Std. (4 Tage)	"
120 Std. (5 Tage)	"
144 Std. (6 Tage)	"

Zu den einzelnen Blutentnahmen wurden die Tiere aus ihren Käfigen geholt und in die Pyrogentestbox gesetzt. Die Entnahmezeit lag zwischen 2 - 4 Min., ausnahmsweise etwas länger.

Vor dem Zentrifugieren des Blutes wurde eine Doppelbestimmung des jeweiligen Hämatokrits durchgeführt.

Das Blut wurde mit 4000 U/Min. bei 4°C 10 Min. lang zentrifugiert. (Zentrifuge Heraeus Christ GmbH Typ 5914). Der Plasmaüberstand wurde in 2 bzw. 3 Portionen aufgeteilt.

1. 0,4 - 0,6 ml für die PRC/PRSC-Bestimmung
2. 0,6 ml für die PRA-Bestimmung (nur bei der Gruppe III)
3. 0,4 ml zur Eiweißbestimmung

1. und 2. wurden bei -25°C eingefroren, 3. bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Auf den Einsatz von Anaesthetika während des Versuches wurde bewußt verzichtet, da durch Anaesthesie ausgelöste Veränderungen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eindeutig gesichert sind (38, 53, 64).

2. Herstellung eines reninarmen, angiotensinogenreichen Plasmas

Die Herstellung eines reninarmen, substratreichen Plasmas ist notwendig, um bei der Plasma-Renin-Konzentrationsbestimmung das Enzym Renin optimal mit seinem Substrat abzusättigen und während der Inkubation eine maximale Umsetzung von Angiotensin I zu gewährleisten. Gleichzeitig soll bei der Zugabe von substratreichem Plasma die gesuchte Plasma-Renin-Konzentration (PRC) nicht durch eigene Reninkonzentrationen verfälscht werden.

Das Prinzip besteht in einer beiderseitigen Nephrectomie der Kaninchen, um die hauptsächlichen Produktionsstätten des Renins aus dem Kreislauf zu entfernen.

Weiterhin bewirkt die Nephrectomie einen Anstieg der Plasma-Renin-Substrat-Konzentration (PRSC) mit einem Maximum nach ungefähr 12 Std. (13). Der Anstieg erfolgt unabhängig von der Entfernung der Nebennieren. Es ist zu berücksichtigen, daß das gewonnene Plasma nicht völlig reninfrei ist, da eine geringe extrarenale Synthese in Uterus, Placenta, Arterienwänden und in den Speicheldrüsen beschrieben ist (50).

a. Chirurgisches Vorgehen

Sechs erwachsene weibliche und männliche Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 3,0 und 4,0 kg wurden verwendet. Die Tiere wurden mit 1 mg Combelen^{R} im. 30 - 45 Min. vor der Operation praemediziert, um sie weitgehend ruhig zu stellen. Zum chirurgischen Eingriff wurden die Tiere in Rückenlage fixiert und durch eine langsame Injektion von 3 ml Trapanal^{R} in die seitliche Ohrvene narkotisiert. Die Vorbereitung und Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Bauchwand wurde durch einen 10 - 15 cm langen Oberbauchschnitt eröffnet. Die Dünndarmschlingen wurden in ein mit physiologischer Kochsalzlösung getränktes Tuch eingeschlagen und die beiden Nieren aufgesucht. Anschließend wurden in der Reihenfolge Ureter, Arterie und Vene unterbunden und durchtrennt und die Nieren un-

ter Erhaltung der Nebennieren entfernt. Nach beidseitiger Nephrectomie wurden die Dünndarmschlingen in das Abdomen rückverlagert, die Bauchdecken vernäht, die Wunde desinfiziert und verbunden.

Für die nächsten 18 - 20 Std. wurden die Kaninchen in ihre Käfige zurückgebracht. Nach diesem Zeitraum waren alle Tiere bei Bewußtsein und die Wunden verschlossen. Danach erfolgte eine zweite Narkose ohne Praemedikation mit 2 ml Trapanal^{R} und Wiedereröffnung des Abdomens. Nach dem Aufsuchen der Bauchaorte wurde diese unterbunden. 2 - 3 cm unterhalb dieser Stelle wurde die Aorta leicht angeritzt, ein Einmal-Venenkatheter Nr. 7 in dieses Gefäß bis zur Abbindungsstelle eingeführt und mit Fäden um die Aorta festgebunden. Das Ende des Katheters mündete in einem 400 ml Becherglas mit 3 Tropfen Heparin. Die erste Abbindungsstelle oberhalb des Katheters wurde eröffnet und in 2 - 3 Min. wurden zwischen 80 und 130 ml arterielles Blut pro Kaninchen aufgefangen, insgesamt 600 ml.

Das Vollblut wurde in Eiswasser abgekühlt, bei 4000 U/Min. und 4°C 10 Min. lang zentrifugiert, der Plasmaüberstand in einen Pool zusammenpipettiert und mit einem Magnetrührer bei 4°C vermischt. Der Pool wurde in Visking-Dialysierschläuche (36/32 Durchmesser 38 mm, Union Carbide Corporation) abgefüllt, enthaltene Luft ausgepreßt und die Schläuche so verschlossen, daß das Flüssigkeitsvolumen noch zunehmen konnte. Diese Dialysierschläuche wurden 2 x 24 Std. in zwei 10 Liter Plastikflaschen mit 2,2 g/l EDTA (Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat) im Kühlraum bei 4°C locker dialysiert. Nach den ersten 24 Std. wurde die EDTA-Lösung erneuert.

Die Dialyse diente zur Entfernung niedermolekularer Substanzen, die sich im Nephrectomieplasma angereichert hatten.

Nach dem Dialysieren wurde das Plasma wieder in einen Pool zusammengebracht, mit einem Magnetrührer vermischt und dann in 10 ml Portionen bis zum Verbrauch bei -25°C eingefroren. Insgesamt ergaben sich 360 ml verwendungsfähiges Nephrectomieplasma.

b. Austestung des Nephrectomieplasmas

Dabei werden 0,5 ml Nephrectomieplasma mit 0,5 ml Inhibitor, wie im Plasma-Renin-Aktivität-Radioimmunassay beschrieben, inkubiert und bestimmt.

15 Min.-Wert	:	0 pg Angiotensin I/ml/Std.
45 Min.-Wert	:	0 pg "
90 Min.-Wert	:	160 pg "

Die Ergebnisse zeigen, daß im Nephrectomieplasma keine AT I-Bildung bis 45 Min. stattfindet.

c. Bestimmung der Substratkonzentration des Nephrectomieplasmas

Sie wird bei der Austestung der Renincharge mit dem Nephrectomieplasma vorgenommen (siehe 3. c.).

3. Gewinnung von Schweinerenin

Da niedrige Reninkonzentrationen mit hohen Plasma-Renin-Substrat-Konzentrationen (PRSC) gepaart sein können, muß bei der PRSC-Bestimmung exogenes Renin im Überschuß hinzugefügt werden. Erst mit diesem Schritt ist die Wiedergabe der tatsächlichen Angiotensinogenkonzentration gewährleistet.

Der juxtaglomeruläre Apparat der Nierenrinde ist seit langem als der hauptsächliche Produktionsort von Renin bekannt. Zur Reninherstellung wurden Schweinenieren verwendet, die uns freundlicherweise vom Tierarzt des Würzburger Schlachthofes überlassen wurden.

a. Herstellung der Renincharge

I. Teil des Arbeitsprozesses 1. Tag

1. Die vollständigen, gesunden Nieren werden viermal aufgetaut und wieder eingefroren, damit die Zellmembranen zerstört und das Renin freigesetzt werden.

2. Mit einem Skalpell wird das Nierenmark von der Nierenrinde getrennt und 100 g Nierenrindengewebe genau abgewogen.

3. Diese Menge wird in 100 ml Aqua bidest. aufgeschwemmt und 2 Min. homogenisiert (Ultra Turrax, Janke und Kunkel KG) bei 20000 U/Min.. Dieses Gemisch wird 15 Min. mit dem Magnetrührer gemischt und 20 Min. bei 8000 - 9000 U/Min. zentrifugiert (Ultrazentrifuge Sorvall, Superspeed RV 2-B).

4. Der Überstand wird abgehoben = Überstand I. Der Zentrifugensatz wird erneut mit 100 ml Aqua bidest. aufgeschwemmt, mit einem Glasstab aufgewirbelt, 15 Min. gerührt und 20 Min. wie vorher zentrifugiert.
   Der jetzt entstandene Überstand = Überstand II
   Überstand I und Überstand II werden vereinigt und mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

5. Der Arbeitsgang fand bisher bei Zimmertemperatur statt. Jetzt wird das Material in der Kühltruhe auf 0°C abgekühlt, die weitere Verarbeitung findet im Eiswasserbad statt.

6. Die Flüssigkeit wird mit H_2SO_4 (2,5 mol/l) auf pH = 2,3 angesäuert, mit dem Magnetrührer vermischt und mit 60 ml Alkohol (950 ml absol. Alkohol/l), der auf -20°C abgekühlt wurde, versetzt.

7. Stehenlassen des Materials 1 Std. lang ohne Rühren bei 0°C.

8. Zentrifugieren 20 Min. bei 8000-9000 U/Min.

9. Einstellen des Überstandes mit KOH (2 mol/l) unter Rühren auf einen pH = 4,5.

10. Die gesamte Flüssigkeit wird in Visking Dialysierschläuchen 36/32 (Durchmesser 38 mm, Union Carbide Corporation) abgefüllt, die enthaltene Luft nach oben ausgepreßt und dann so verschlossen, daß das Flüssigkeitsvolumen in den Schläuchen noch zunehmen kann.

    Die Dialyseschläuche werden dann in zwei 10 l Plastikflaschen gehängt und gegen Aqua bidest. über Nacht dialysiert. (Die Plastikflaschen werden schon morgens im Kühlraum deponiert, um sie auf die richtige Temperatur zu bringen).

II. Teil des Arbeitsganges 2. Tag

11. Der Inhalt der Dialysierschläuche wird am nächsten Morgen vorsichtig in einen Meßzylinder gefüllt und mit eisgekühltem Aqua bidest. auf 740 ml aufgefüllt.

12. Die Flüssigkeit wird nun mit H_2SO_4 (2,5 mol/l) auf einen pH = 2,8 unter Rühren eingestellt.

13. Zugabe von

    a. 36 g festen NaCl, Körnchen für Körnchen, unter 15 Min. Rühren und 10 Min. Zentrifugieren mit 10 000 U/Min. Der Überstand wird in ein 1000 ml Becherglas abgehoben.

    b. 104 g festen $(NH_4)_2SO_4$, Körnchen für Körnchen, unter 15 Min. Rühren und 10 Min. Zentrifugieren. Der Überstand wird abgehoben.

    c. 158 g festen $(NH_4)_2SO_4$, Körnchen für Körnchen, unter 15 Min. Rühren und 10 Min. Zentrifugieren. Den Überstand läßt man langsam ablaufen.

14. Das übriggebliebene Sediment wird mit 10 ml Aqua bidest. aufgeschwemmt und von Glas zu Glas weiter gegossen, so daß möglichst das gesamte Sediment gelöst wird (Prozedur mit 2 x 5 ml durchführen).
    Die 10 ml werden in zwei Visking-Dialysierschläuchen 8/32 (Durchmesser 7 mm, Union Carbide Corporation) über Nacht wieder locker gegen kaltes Aqua dest. dialysiert.

III. Teil des Arbeitsganges 3. Tag

15. Am nächsten Tag entleert man den Inhalt der Dialyseschläuche in Zentrifugengläser und zentrifugiert diese 10 Min.

16. Die Charge wird weiterhin bei $0^{\circ}C$ gehalten.

17. Vornahme von vier pH-Korrekturen, um noch vorhandene Rest-Angiotensinasen zu zerstören.

    a. mit NaOH (1 mol/l) auf pH = 9,8, eine Stunde stehenlassen

    b. mit HCL (1 mol/l) auf pH = 5,5, fünf Min. stehenlassen

    c. mit NaOH (1mol/l) auf pH = 9,8, eine Stunde stehenlassen

    d. mit HCL (1mol/l) auf pH = 5,5

18. Die gesamte Renincharge (17 ml) wird in 1 ml Portionen bei -25°C eingefroren.

b. Austestung der Renincharge auf Angiotensinasenfreiheit

Die sog. Angiotensinasen sind Peptidasen, die Angiotensin II durch Spaltung in unwirksame Komponenten inaktivieren. Um eine vorhandene Angiotensinasenwirkung, trotz intensiver Vorbehandlung, auszuschließen, wird eine bestimmte Menge Angiotensin I mit der Renincharge über 120 Min. inkubiert. Eine Abnahme der eingesetzten Angiotensin I-Menge würde auf die Anwesenheit noch unbeseitigter Angiotensinasen hinweisen.

Ansatz: 0,610 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH = 5,9)
1,000 ml MRC-Jleu-5-Angiotensin I Standard
0,200 ml der Renincharge (pH = 6,5)
1,810 ml

Der gesamte Ansatz wird gevortext und in 5 Proportionen a 0,35 ml aufgeteilt.

1. Probe		Leerwert, bleibt im Eis
2. Probe	15 Min.	Inkubation bei 37°C im Wasserbad
3. Probe	30 Min.	"
4. Probe	60 Min.	"
5. Probe	120 Min.	"

Nach der Inkubation werden die Proben im Eiswasserbad abgekühlt und 10 Min. zentrifugiert.

Von Probe 1 - 5 werden 50 µl in den RIA eingebracht.

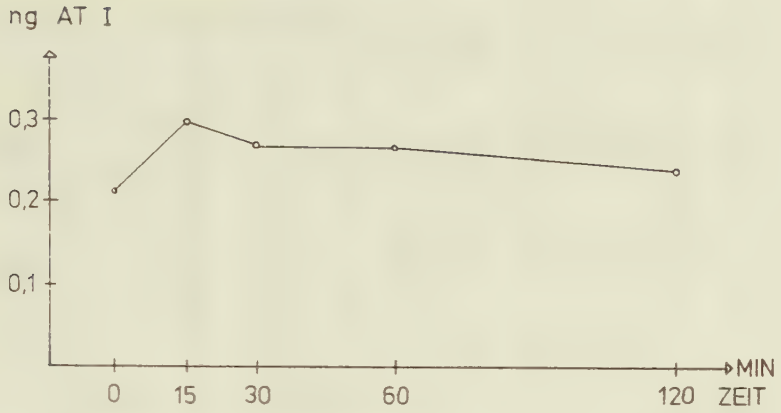


Abb. 2: Austestung der Renincharge auf Angiotensinasenfreiheit

Die Inkubation des Reaktionsgemisches über 120 Min. zeigte keine wesentliche Änderung der Angiotensin I-Menge. Dies wurde als Beweis angesehen, daß die Renincharge nahezu angiotensinasenfrei war.

c. Austestung der Renincharge mit dem Nephrectomieplasma

Nachdem in einer ersten Substrattestung die Aktivität der Renincharge so hoch war, daß bereits 10 µl das gesamte vorhandene Angiotensinogen in Angiotensin I umsetzten, wurde die ursprüngliche Renincharge 1 : 5 mit Aqua bidest. verdünnt. Aus 15 ml Reninlösung konnten 75 ml der endgültigen Renincharge gewonnen werden. Mit steigender Reninmenge von 1 - 400 µl wurde untersucht, ab welchem Punkt das gesamte Renin-Substrat des Nephrectomieplasmas in Angiotensin I umgesetzt wurde. Gleichzeitig bestimmten wir damit die Plasma-Renin-Substrat Konzentration (PRSC) des Nephrectomieplasmas.

Zusammensetzung der Reaktonsansätze (Angaben in µl)

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl (9g/l)	600	599	595	590	550	500	400	200
EDTA (0,1 mol/l)	60	60	60	60	60	60	60	60
DFP (5g/l in Isopropylalkohol)	10	10	10	10	10	10	10	10
Neomycinsulfat (5g/l)	200	200	200	200	200	200	200	200
Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH = 6,5)	200	200	200	200	200	200	200	200
Renin	-	1	5	10	50	100	200	400
Nephrectomieplasma	50	50	50	50	50	50	50	50

DFP (Diisopropylfluorphosphat), EDTA (Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

Der Phosphatpuffer wird aus $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (0,1 mol/l) und KH_2PO_4 (0,1 mol/l) gemischt, bis ein pH von 6,5 erreicht ist.

Die acht Proben werden, wie in der PRSC-Bestimmung beschrieben, inkubiert und in den Radioimmunassay (RIA) eingebracht und berechnet.

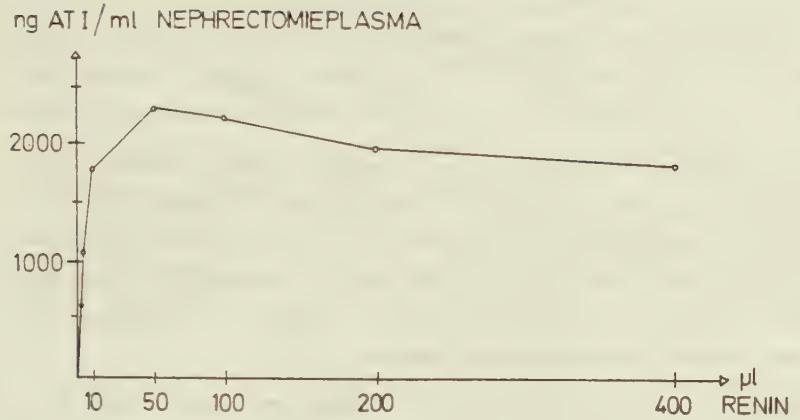


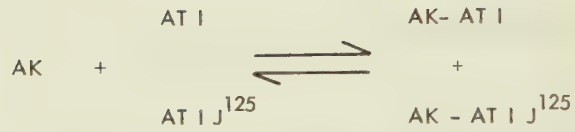
Abb. 3: Austestung der Reninchargе mit dem Nephrectomieplasma

Die Inkubation steigender Reninmengen mit 50 µl Nephrectomieplasma ergab schon bei geringer Dosis einen steilen Konzentrationsanstieg von Angiotensin I. 50 µl der Reninchargе bewirkte eine vollständige Umwandlung des vorhandenen Renin-Substrates. Die dabei gemessene Substratkonzentration des Nephrectomieplasmas betrug 2333 ng Angiotensin I/ml. Zusätzliches Renin führte zu keiner weiteren Steigerung der Angiotensin I-Bildung.

4. Radioimmunologische Bestimmung von Plasma-Renin-Aktivität (PRA), Plasma-Renin-Konzentration (PRC) und Plasma-Renin-Substrat-Konzentration (PRSC)

Allgemeiner Abschnitt

Das Prinzip der PRA-, PRC- und PRSC-Bestimmung besteht "in der quantitativen Erfassung der Antigen-Antikörper Reaktion zwischen dem Hormon (Angiotensin I) und seinem spezifischen Antikörper unter Verwendung von radioaktiv markiertem Hormon (Angiotensin I J^{125}) als Leitsubstanz" (65). Körpereigenes (AT I) und markiertes Angiotensin I (AT I J^{125}) reagieren mit dem Antikörper (AK) zu folgenden Komplexverbindungen:



Das freie radioaktive AT I wird mit einer Dextrankohlesuspension adsorbiert, so daß die im Szintillationszähler gemessene Aktivität weitgehend der Aktivität des AK - AT I J^{125} - Komplexes entspricht. Je größer die AT I-Konzentration des zu untersuchenden Plasmas ist, desto mehr Antikörper bindet sich mengenmäßig an das nicht markierte Hormon. Die Impulsrate dieser Probe ist erniedrigt, bei umgekehrten Verhältnissen wird eine hohe Radioaktivität registriert.

Während die Plasma-Renin Aktivität (PRA) die Reaktion von endogenem Renin mit endogenem Substrat wiedergibt, wird bei der Plasma-Renin-Konzentrationsmessung (PRC) ein exogener Substratüberschuß zugegeben. Damit wird verhindert, daß bei hoher Reninsekretion unzureichende Substratspiegel fälschlich zu niedrige PRC-Werte ergeben. Für die PRSC-Bestimmung ist die Zugabe von Renin im Überschuß erforderlich, so daß auch bei hohen Angiotensinogenkonzentrationen im Plasma eine völlige Umsetzung von Angiotensinogen in Angiotensin I gewährleistet ist.

Spezieller Abschnitt

a. PRSC-Bestimmung mit dem Radioimmunassay (RIA)

Arbeitsschritte im 1. Teil des RIA

Ansetzen eines Reaktionsgemisches

500 µl NaCl (9g/l)
60 µl EDTA (0,1 mol/l)
10 µl DFP (5g/l in Isopropylalkohol)
200 µl Neomycinsulfat (5g/l)
200 µl Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH = 6,5)
100 µl des hergestellten Schweinerenins (pH = 6,5)

1,070 ml

Die Plasmen, inzwischen aufgetaut, werden gevortext und 10 Min. bei 4000 U/Min. und 4°C zentrifugiert. 50 µl der jeweiligen Plasmaprobe werden mit 1,070 ml des Reaktionsansatzes vermischt, gevortext und genau 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Proben 5 Min. im Wasserbad abgekocht, im Eiswasserbad abgekühlt und 10 Min. bei 4000 U/Min. und 4°C zentrifugiert. Die Inkubationsansätze werden entweder in Eiswasser gehalten, wenn eine Verarbeitung am selben Tag erfolgen kann oder zur späteren Verarbeitung bei -25°C eingefroren, was die Bestimmung nicht beeinflußt. Falls die Proben eingefroren werden, müssen sie nach dem Auftauen nochmals gevortext und zentrifugiert werden. Der weitere Ablauf des RIA erfolgt ausschließlich bei Eiswasserkühlung (2 - 4°C).

Für die PRSC-Bestimmung werden von jedem Plasmaansatz Verdünnungsstufen angefertigt (1:11, 1:21, 1:41, 1:61, 1:81), Verdünnungsmedium ist Phosphatpuffer mit Rinder-Serum-Albumin (pH = 7,4).

Dieser Phosphatpuffer setzt sich folgendermaßen zusammen:

Na_2HPO_4 (10,6 g/l) und
EDTA (3,72 g/l) werden gelöst und mit
Rinder-Serum-Albumin (1 g/l Phosphatpuffer) vervollständigt.

Die einzelnen Verdünnungen werden mit dem Probereagenzdosierer Nr. 5231 (Eppendorf) wie folgt angesetzt:

Verdünnungsstufen	Probe	Phosphatpuffer mit Serum-Albumin
1:11	20 µl	0.200 ml
1:21	20 µl	0,400 ml
1:41	20 µl	0,800 ml
1:61	20 µl	1,200 ml
1:81	20 µl	1,600 ml

Der weitere Ablauf des RIA ist für die Bestimmung der PRC, PRA und PRSC identisch. Zuerst erfolgt die Vorbereitung der, für den 2. Teil des RIA erforderlichen Substanzen.

Standard:

Für die Aufstellung einer Standardkurve wird MRC-Ileu 5-Angiotensin I Standard verwendet. Die Arbeitslösung enthält 10 ng/0,5 ml. Diese Lösung wird mit Phosphatpuffer mit Serum-Albumin 1:1 verdünnt und dient als S_1 der Standardverdünnung (10 ng/ml). Da nur 50 µl von S_1 im RIA verwendet wird, hat der 1. Punkt der Standardkurve eine Konzentration von 0,5 ng/50 µl. Die folgenden S-Werte, da sie ebenfalls 1:1 verdünnt werden, besitzen jeweils die Hälfte der Konzentration.

0,5 ml Arbeitslösung MRC-Angiotensin I
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_1

0,5 ml von S_1
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_2

0,5 ml von S_2
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_3

0,5 ml von S_3
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_4

0,5 ml von S_4
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_5

0,5 ml von S_5
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_6

0,5 ml von S_6
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_7

0,5 ml von S_7
+ 0,5 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin → S_8

Aktivität-J^{125}-Angiotensin I

Das für den RIA zu verwendende Angiotensin I-5-L-Isoleucin-Tyrosyl-J^{125} stammt von der Firma NEN. 10 µ Curie des lyophilisierten J^{125}-Angiotensin I werden mit 0,2 ml "aqua pro injectione steril" gelöst. Der Ansatz wird gut gevortext und auf 8 Röhrchen je 25 µl aufgeteilt und bei -25°C im Bleizylinder eingefroren.

Für den jeweiligen RIA werden zwei 25 µl J^{125} Angiotensin I-Gläschen aufgetaut und mit je 8 - 10 ml Phosphatpuffer ohne Serum-Albumin verdünnt. Die Verdünnung ist so vorzunehmen, daß 50 µl Aktivität in einem Volumen von 0,750 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin 9000 - 10000 Impulse/Min. ergeben.

Angiotensin-I-Antikörper

Als Angiotensin I-Antikörper wurde eine Präparation (Prof. Ganten, Pharmakol. Institut der Univ. Heidelberg) verwendet, von der 0,1 ml als Arbeitslösung in einer Verdünnung von 1:20 bei -25°C lagerte. 0,1 ml dieses Antikörpers wurde mit 39,9 ml Phosphatpuffer ohne Serum-Albumin auf 1:8000 gebrauchsfertig verdünnt und mit dem Magnetrührer gut vermischt.

Dextran-Aktivkohle

Zum Abfang der freien, nicht an den Antikörper gebundenen J^{125}-Angiotensin I-Aktivität nach 16-18 Std. Inkubation, wird den einzelnen Proben jeweils 0,250 ml Dextran-Aktivkohle zugesetzt:

Ansatz:

500 mg Aktivkohle und 50 mg Dextran T 70 werden in 33 ml Phosphatpuffer mit Serum-Albumin gelöst.

Vor dem Pipettieren wird die Kohlelösung 10 Min., in Eiswasser abkühlend, mit einem Magnetrührer in Suspension gehalten. Beim Pipettieren der Kohle in Gläschen soll in einem Arbeitsgang der Zeitraum von 2 Min. nicht überschritten werden (in unserer Hand ca. 50 Röhrchen).

Arbeitsschritte im 2. Teil des RIA schematisch dargestellt

Von jeder Probe, Verdünnungsstufe und Standard werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Pipettierung der Flüssigkeiten wird mit dem Probereagenzdosierer Nr. 5231, die des Antikörpers mit dem Reagenzdosierer Nr. 5210 (Eppendorf) vorgenommen.

REAGENZIEN

Teströhrchen	c	u	a	S_1-S_8	Proben
Phosphatpuffer mit Serum-Albumin	450 µl	450 µl	400 µl	350 µl	350 µl
J^{125}-Angiotensin I	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Standard S_1-S_8				50 µl	
Proben					50 µl
Antikörper			50 µl	50 µl	50 µl

Alle Röhrchen werden gevortext und bei 4°C 16-18 Std. inkubiert

Nächster Arbeitsgang:

Teströhrchen	c	u	a	S_1-S_8	Proben
Monitrol I^R			50 µl	50 µl	
Phosphatpuffer mit Serum-Albumin	300 µl	50 µl			50 µl
Kohle		250 µl	250 µl	250 µl	250 µl

Nach dem Pipettieren der Kohle werden die Gläschen gevortext und nach 10 Min. Abwarten bei 4000 U/Min., 4°C, 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Zentrifugenröhrchen dekantiert, verschlossen und die Radioaktivität eine Min. gezählt (Gammaszint 5300, Bertold Frieseke).

b. Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration (PRC)

Die PRC-Wasserbad-Inkubation wird gleichzeitig mit der PRSC-Inkubation durchgeführt, um die Plasmen nicht ein zweites Mal auftauen zu müssen.

Das Nephrectomieplasma wird aufgetaut, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Becherglas abgekippt und mit dem pH-Meter auf einen pH=6,5 mit NaOH (1 mol/l) oder HCL (1 mol/l) eingestellt.

Anschließend wird ein "Mischpool" angesetzt, der folgende Reagenzien/Probe enthält:

400 µl Nephrectomieplasma (pH = 6,5)
350 µl Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH = 6,5)
100 µl EDTA-Lösung (0,1 mol/l)
5 µl DFP (5 g/l in Isoprophylalkohol)

855 µl

Nach Mischung dieses Pools werden davon 0,855 ml entnommen, mit 0,1 ml der einzelnen Plasmen zusammenpipettiert und gevortext. 0,5 ml dieser Proben werden bei 37°C 30 Min. im Wasserbad inkubiert, während die restlichen 0,455 ml als uninkubierter Wert im Eiswasser verbleiben. Nach Beendigung der Inkubation werden alle Proben auf 4°C abgekühlt, gevortext, zentrifugiert und eingefroren oder weiter verarbeitet. Beim Wiederauftauen wird wie bei der PRSC-Bestimmung verfahren.

Von den inkubierten Proben werden zusätzlich Verdünnungen von 1:2 und 1:5 angesetzt: also 0,1 ml inkubierte Probe mit entweder 0,1 ml oder 0,4 ml Phosphatpuffer mit Rinder-Serum-Albumin. Von allen verdünnten und unverdünnten Proben werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

c. Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA)

Die für die Bestimmung vorgesehenen Plasmen werden aufgetaut, gevortext und 10 Min. bei 4000 U/Min. und 4°C zentrifugiert. Vom zentrifugierten Plasma werden 0,5 ml und 0,5 ml eines Inhibitors zusammenpipettiert und gevortext.

Der Inhibitor besteht aus:

Reagenzien: 1.	BAL (Dimercaprol)	1 g/l
2.	8-Hydroxychinolinsulfat	1,32 g/l
3.	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	0,1 g/l
4.	KH_2PO_4	21,7 g/l

A. Puffergemisch 3 und 4 mit ca. 800 ml Aqua bidest. in Lösung bringen, dann

B. 8-Hydroxychinolinsulfat zusätzlich lösen und

C. BAL (1 g in 12,5 ml absol. Alkohol) zugeben

D. A+B+C mit dem Magnetrührer gut mischen und mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Anschließend wird der Ansatz lyophylisiert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Der PRA-Enzyminhibitor wird wieder gebrauchsfähig durch Lösen von
241,2 mg Inhibitor (lyophilisiert) in 10 ml Aqua bidest.
und Mischen mit dem Magnetrührer.

Die sich ergebenden 1,0 ml (0,5 ml Plasma + 0,5 ml Inhibitor) werden in 4 Fraktionen aufgeteilt:

1. 0,250 ml für 15 Min. Wasserbadinkubation bei 37°C
2. 0,250 ml für 45 Min. "
3. 0,250 ml für 90 Min. "
4. 0,250 ml verbleiben im Eiswasser

Das Plasma-Inhibitorgemisch hat einen pH von 5,7-5,9. Nach dem Ende der jeweiligen Wasserbadinkubation werden die Gläschen sofort in Eiswasser gesetzt. Die Proben werden zusammen gevortext, zentrifugiert und dann in Doppelbestimmung in den beschriebenen 2. Teil des RIA eingebracht.

d. Berechnung der Ergebnisse

Zuerst bestimmt man die Durchschnittszählrate (DZR) von jeder Doppelbestimmung. Weichen die Ergebnisse mehr als 15 % voneinander ab, werden sie nicht berücksichtigt. Sodann wird die spez. und unspez. Bindung des RIA in Prozent errechnet.

Die spezifische Bindung=

$$\frac{\text{a-Wert (Null-Punkt der Kurve)}}{\text{Gesamtaktivität (c-Wert)}} \times 100$$

gibt die Bindungsfähigkeit des Antikörpers wieder. Bei den 21 durchgeführten RIA-Testen liegt die spez. Bindung zwischen 47,16 % und 65,25 %.

Die unspezifische Bindung=

$$\frac{\text{u-Wert}}{\text{Gesamtaktivität (c-Wert)}} \times 100$$

gibt eine gute Aussage über die Adsorption von freiem Angiotensin I-J^{125} durch die Dextran-Aktivkohle und liegt bei den 21 durchgeführten RIA zwischen 1,62 % und 2,69 %.

Eichkurve

Die Eichkurve wird auf halblogarithmisches Papier aufgetragen. Die Konzentrationen des Standards S_1 bis S_8 werden in pg Angiotensin I an der Abszisse, ihre entsprechenden Impulsraten/Min. an der Ordinate aufgetragen. Dabei ist S_1 = 500 pg Angiotensin I der Anfangspunkt und der a-Wert mit 0 pg Angiotensin I der Endpunkt der Kurve.

An Hand des DZR der Proben kann der Angiotensin I Gehalt in pg an der Abszisse abgelesen werden.

Berechnung der PRSC- in ng Angiotensin I/ml

Das gesamte Volumen eines PRSC-Inkubationsansatzes beträgt 1,12 ml, davon 50 µl Testplasma. In die Radioimmunreaktion werden von den 1,12 ml 50 µl eingesetzt

50 µl ist der 22,4 Teil von 1,12 ml

der 22,4 Teil von 50 µl Testplasma = 2,23 µl

Um die 2,23 µl auf 1 ml Plasma umzurechnen, wird der abgelegesene Wert der Proben auf der Standardkurve mit 448,4 multipliziert.

2,23 µl x 448,4 = 0,999932 ml.

Da die Inkubationsansätze noch 1:11, 1:21, 1:41, 1:61, 1:81, verdünnt sind, müssen wir noch mit 11, 21, 41, 61, 81 multiplizieren und erhalten ng Angiotensin I/ml Plasma.

PRC-Berechnungen in ng Angiotensin I/ml/30 Min.

Der PRC-Gesamtansatz beträgt 0,955 ml, davon 0,1 ml Testplasma. Vom Gesamtansatz werden 0,5 ml inkubiert.

Die Menge an inkubierten Plasma:

$$\frac{0{,}5 \text{ ml} \times 0{,}1 \text{ ml}}{0{,}955 \text{ ml}}$$

= 52,4 µl Plasma

Von den 0,5 ml des Inkubates werden 50 µl = 1/10 in den RIA eingebracht, entspricht 5,24 µl Plasma. Da sich die PRC auf 1 ml Plasma bezieht, ist die Multiplikation mit 9,8 x 20 notwendig. Die sog. d-Plasmaprobe ist die in Eiswasser gehaltene PRC, während die bei 37°C inkubierten Proben als e-Proben bezeichnet werden.

Für die Berechnung gilt:
An der Standardkurve abgelesener AT-Gehalt der Probe
(e (x Verdünnung) -d) x 9,8 x 20 = ng AT I/ml/30 Min.

PRA-Berechnungen in ng Angiotensin I/ml/h

Der PRA-Ansatz besteht aus 0,5 ml Testplasma und 0,5 ml Inhibitor = 1 ml. 1,0 ml werden in vier Fraktionen a 0,250 ml aufgeteilt, d.h. in 0,250 ml sind 0,125 ml Testplasma. Von den 0,250 ml werden 50 µl in den RIA eingebracht = 1/5. Darin sind 0,125 ml/5 = 25 µl Plasma enthalten. 25 µl mit 40 multipliziert, ergibt 1 ml Testplasma.

Auch hier bezeichnet d-Plasmaprobe den in Eiswasser gehaltenen Anteil, während die anderen Proben 15 Min., 45 Min. bzw. 90 Min. inkubiert werden.

Berechnung der PRA:

An der Standardkurve abgelesener AT-Gehalt der

(15 Min. Inkubation -d) x 4 x 40 = ng AT I/ml/h

(45 Min. Inkubation -d) x 4/3 x 40 = ng AT I/ml/h

(90 Min. Inkubation -d) x 2/3 x 40 = ng AT I/ml/h.

5. Bestimmung des Gesamteiweißes

Die Bestimmung des Gesamteiweißes erfolgte nach der Biuret-Methode.

Das Biuret Reagenz wurde nach der Methode von WEICHSELBAUM (Am. J. Clin. Pathol. 7 (1946), 40) angesetzt. Die kalorimetrische Messung wurde mit dem Photometer "Eppendorf" (Netheler u. Hinz GmbH, Hamburg) durchgeführt.

Bei der Berechnung der Extinktionswerte wurde die Extinktion eines Kontrollserums (Monitrol I Dade^{R}) durch den bekannten Eiweißgehalt dividiert. Der resultierende Faktor diente dann zur Multiplikation mit den Mittelwerten der Extinktion der Plasmaproben und ergab den Eiweißgehalt in g/l.

6. Hämatokrit-Bestimmung

Von jeder Blutprobe wurden zwei Hämatokritmessungen durchgeführt und ein Mittelwert errechnet. Zur Hämatokritbestimmung dienten heparinisierte Kapillarröhrchen (Länge 75 mm, äußerer Durchmesser 1,3 - 1,4 mm). Die Kapillarröhrchen wurden an einem Ende verschmolzen und fünf Minuten zentrifugiert (Internat. Micro-Capillary Centrifuge Marke MB, Internat. Equipment Company, Boston, Mass.). Die Ablesung des Hämatokritwertes geschah durch den Internat. Micro-Capillary-Reader (der gleichen Firma).

7. Blutdruckmessung

Fünf Kaninchen wurden der gleichen Hämorrhagie (21,5 ml/kg) unterzogen wie die Gruppe III. Anstatt eine Blutprobe zu entnehmen, wurde der Blutdruck über den Kontrollzeitraum gemessen. Der systolische Blutdruck der Kaninchen wurde an der zentralen Ohrarterie nach der Methode von GRANT und ROTHSCHILD (29) bestimmt. Jeder Einzelwert stellt den Mittelwert aus vier Messungen im Abstand von einer Minute dar.

8. Gewichtsbestimmung

Das Gewicht der Kaninchen wurde vor und nach Abschluß des Versuches mit einer Waage Marke "Soehnle" bestimmt.

9. Statistische Berechnungen

Die Errechnung der PRSC-, PRC- und PRA-Werte erfolgte mit dem Taschenrechner Casio Modell 121-L, die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen mit dem Taschenrechner Casio AL-10 electronic calculator.

Die Signifikanz wurde mit einem Olivetti-Tischrechner (programma 101) bestimmt. Die p-Werte wurden unter Benutzung der Studentverteilung in den wissenschaftlichen Tabellen von Documenta Geigy abgelesen, p-Werte $< 0,05$ wurden als "signifikanter" Unterschied gewertet.

III. ERGEBNISSE

1. Allgemeinzustand der Kaninchen

Die Entblutung hatte auf das Verhalten der Gruppe I keinen sichtbaren Einfluß. Dagegen nahmen die Tiere der Gruppe III und teilweise der Gruppe II nach Abschluß des Versuches eine starke Schonhaltung (Kauerstellung) ein, mit auffällig geringen Lage- und Ortswechseln. Wir hatten den Eindruck, daß die Futter-, weniger die Wasseraufnahme reduziert war, ohne dies exakt bilanziert zu haben.

Die unterschiedlichen Belastungen machten sich auch in Gewichtsveränderungen bemerkbar. Die Gruppe I nahm im Mittel 112 g zu, die Gruppe II hatte einen geringen Verlust von 26 g. Die Gruppe III verlor 55 g, die Tiere, die nur zur Blutdruckmessung verwendet wurden 70 g.

Tab. 1: Gewichtsangaben in kg

	Gewicht vor dem Versuch	Gewicht nach sechs Tagen	(+) Zunahme (-) Abnahme
Gruppe I	3,566 ± 0,43	3,678 ± 0,29	+ 0,112
Gruppe II	2,928 ± 0,26	2,902 ± 0,30	- 0,026
Gruppe III	3,212 ± 0,38	3,157 ± 0,17	- 0,055
Blutdruckmeß-gruppe	3,340 ± 0,58	3,270 ± 0,59	- 0,070

2. Plasma-Renin-Konzentration vor und nach Hämorrhagie

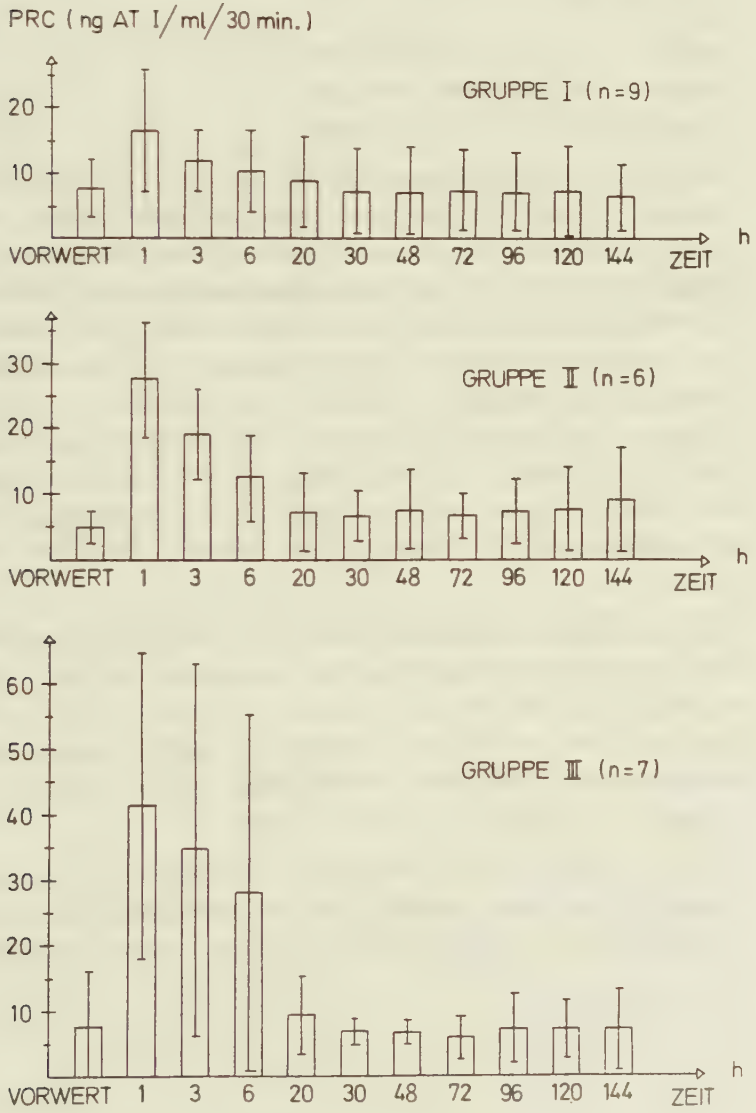
Die Auswirkungen eines unterschiedlich starken Blutentzugs auf die PRC über den Versuchszeitraum von sechs Tagen sind in Abb. 4 dargestellt. Die mittlere basale PRC bei Kaninchen wurde auch hier aus den Vorwerten bestimmt und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen:

Gruppe I	(n = 9)	7,8 ± 4,4 ng/ml/30 min.
Gruppe II	(n = 6)	5,2 ± 2,7 ng/ml/30 min.
Gruppe III	(n = 7)	7,7 ± 8,4 ng/ml/30 min.

Die Werte differierten von denen in der Literatur angegebenen erheblich (12, 49), könnten aber auf die unterschiedlichen Methoden zurückgeführt werden.

Die PRC zeigte in allen Gruppen zeitlich parallele Veränderungen, die sich jedoch quantitativ unterschieden. In der ersten Gruppe stieg die PRC auf 16,5 ± 9,2 ng/ml/30 min. nach einer Stunde, damit auf das Doppelte ($p < 0,025$). Der mittlere PRC-Wert in Gruppe II nach einer Stunde betrug 27,7 ± 8,8 ng/ml/30 min., war somit vierfach erhöht ($p < 0,001$). Die dritte Gruppe wies den stärksten Anstieg mit 41,5 ± 23,6 ng/ml/30 min. ($p < 0,005$) auf. In der darauffolgenden Versuchszeit lag die PRC in Gruppe I zum Zeitpunkt drei Stunden bei 11,9 ± 4,5 ng/ml/30 min., in Gruppe II bei 19,2 ± 7,0 ng/ml/30 min., in Gruppe III bei 34,6 ± 28,6 ng/ml/30 min., war also in allen Gruppen abgestuft, in Abhängigkeit von der Größe des Blutentzugs erhöht. Zum Zeitpunkt 20 Stunden nach der Hämorrhagie war in allen Gruppen eine Normalisierung der PRC erkennbar.

Abb. 4: Plasma-Renin-Konzentration vor und nach Hämorrhagie



3. Plasma-Renin-Substratkonzentration vor und nach Hämorrhagie

Die mittlere basale PRSC bei Kaninchen unterschied sich in den verschiedenen Versuchsgruppen nicht:

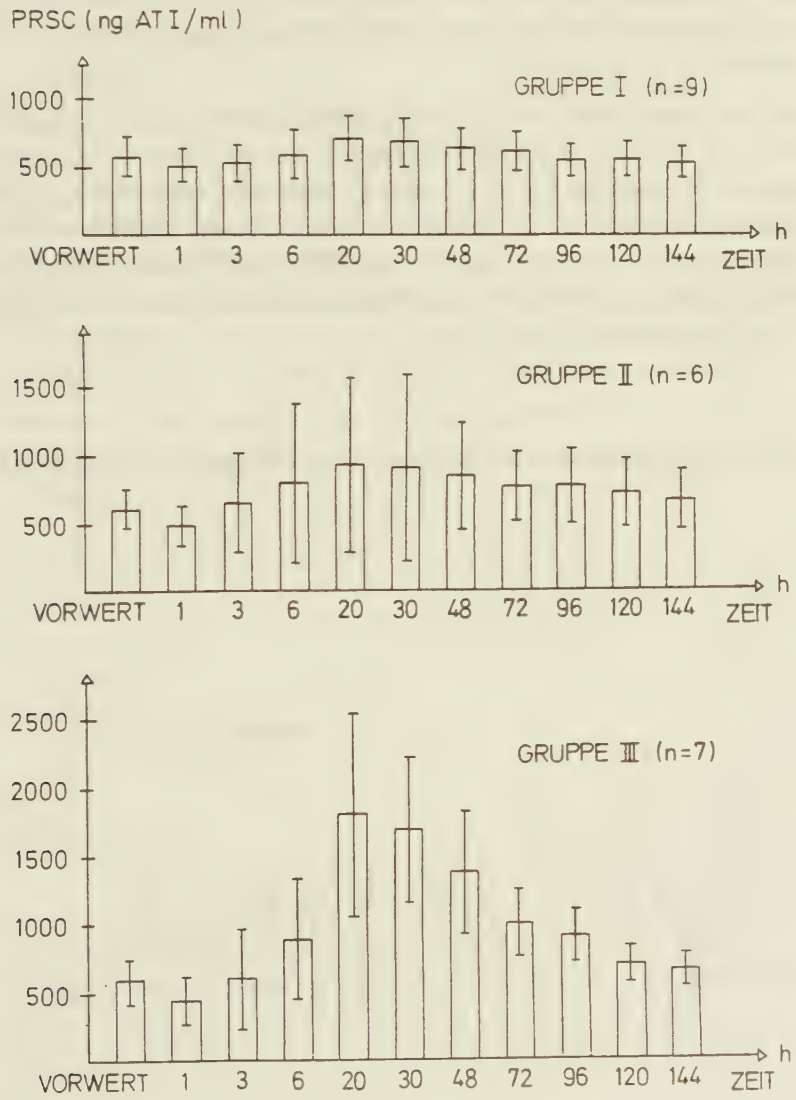
Gruppe I	(n = 9)	557 ± 149 ng/ml
Gruppe II	(n = 6)	590 ± 140 ng/ml
Gruppe III	(n = 7)	587 ± 173 ng/ml.

Diese Werte entsprachen den Angaben anderer Autoren (12, 44, 49, 60). Die Veränderungen der PRSC im Anschluß an die Hämorrhagie zeigten qualitativ die gleiche Tendenz, unterschieden sich aber erheblich in quantitativer Hinsicht. So fiel auf, daß die PRSC nach einer Stunde in allen Gruppen gegenüber dem Ausgangswert abfiel. Der Abfall war jedoch nicht signifikant (alle p-Werte $> 0,05$). Während für alle Gruppen nach drei Stunden im Mittel Normalwerte zu verzeichnen waren, entwickelte sich zum Zeitpunkt sechs Stunden nach der Entblutung eine Konzentrationszunahme von Renin-Substrat. Für die Gruppe I betrug die Veränderung durchschnittlich + 3 %, für Gruppe II + 32 %, für Gruppe III + 50 % gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. Dennoch war unverkennbar, daß vor allem in Gruppe II und III, gekennzeichnet durch hohe Standardabweichung, erhebliche interindividuelle Schwankungen vorlagen.

Die Substratkonzentration erreichte innerhalb der einzelnen Gruppen den höchsten Wert nach 20 Stunden. Gruppe I stieg aber nur unwesentlich auf 684 ± 174 ng/ml an, Gruppe II auf 905 ± 644 ng/ml, Gruppe III auf 1787 ± 747 ng/ml. Letzter Wert war gegenüber dem Basalwert verdreifacht ($p < 0,005$), unterschied sich auch gegenüber den 20 Stunden Werten der beiden übrigen Gruppen signifikant (Gruppe I/III $p < 0,001$, Gruppe II/III $p < 0,05$).

Die PRSC fiel zu den folgenden Zeitpunkten zunächst langsam, dann stärker ab und unterschritt in der Gruppe I nach 96 Stunden den Ausgangswert. Gruppe II und Gruppe III waren nach sechs Tagen noch nicht völlig zur Norm zurückgekehrt.

Abb. 5: Plasma-Renin-Substratkonzentration vor und nach Hämorrhagie

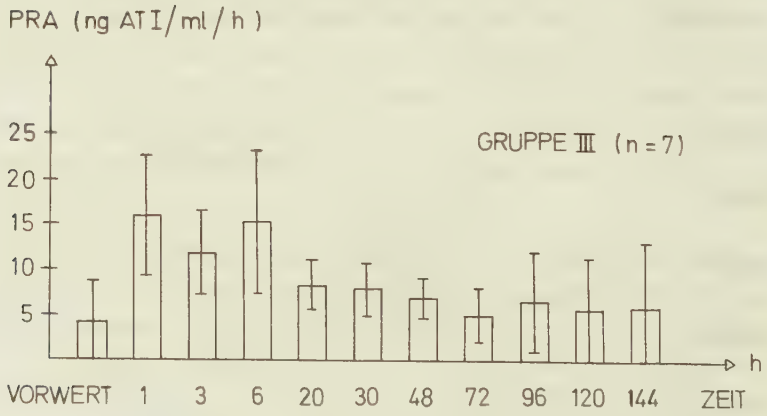


4. Plasma-Renin-Aktivität in Gruppe III

Die Veränderungen der Plasma-Renin-Aktivität (PRA), isoliert für Gruppe III untersucht, ergeben sich aus Abb. 6. Die mittlere basale PRA für Kaninchen (n = 7) betrug 4,1 ± 4,6 ng AT I/ml/h. Dieser Wert stimmte mit Angaben in der Literatur überein (33, 44, 49, 60, 71).

Die PRA zeigte parallel zur PRC, einen signifikanten Anstieg nach einer Stunde um knapp das Vierfache (15,9 ± 6,7 ng/ml/h, $p < 0,005$). Nach drei Stunden ergab sich ein Abfall auf 11,7 ± 4,7 ng/ml/h. Nach sechs Stunden kam es zu einem Wiederanstieg auf 15,1 ± 7,9 ng/ml/h ($p < 0,01$), mit einem anschließenden Abfall bis zum Ende des Versuches, ohne die Ausgangswerte ganz zu erreichen. Auch hier waren, gekennzeichnet durch die große Standardabweichung erhebliche interindividuelle Unterschiede gegeben.

Abb. 6: Plasma-Renin-Aktivität der Gruppe III (n = 7) vor und nach Hämorrhagie



5. Gesamteiweiß vor und nach steigendem Blutentzug

Der Verlauf der Plasma-Gesamteiweißkonzentration nach Blutentzug ergibt sich aus Abb. 7.

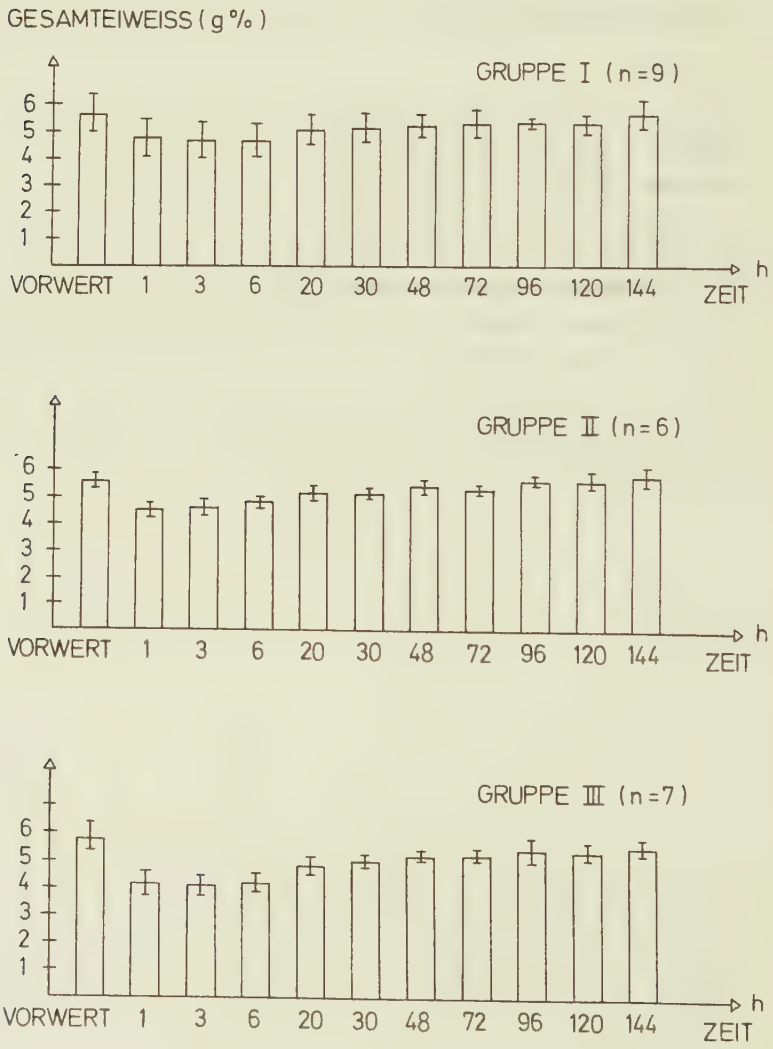
Die Durchschnittsproteinkonzentration bei Kaninchen vor Blutentzug differierte in den Gruppen nicht:

Gruppe I (n = 9) 55,7 $\pm$ 7,0 g/l
Gruppe II (n = 6) 53,8 $\pm$ 3,0 g/l
Gruppe III (n = 7) 57,8 $\pm$ 5,3 g/l

Der Abfall der Proteinkonzentration nach einer Stunde war in allen Gruppen signifikant, hatte aber zu diesem Zeitpunkt nur in der Gruppe II mit 43,4 $\pm$ 3,3 g/l ($p < 0,001$) seinen Tiefpunkt, in der Gruppe III nach drei Stunden mit 40,8 $\pm$ 4,3 g/l ($p < 0,001$), in Gruppe I nach sechs Stunden mit 46,2 $\pm$ 6,7 g/l ($p < 0,01$).

Im weiteren Versuchsablauf stiegen die Gesamtproteinkonzentrationen im Plasma kontinuierlich an und hatten bis auf Gruppe III den Ausgangswert erreicht bzw. überschritten.

Abb. 7: Gesamteiweiß im Plasma vor und nach Hämorrhagie



6. Hämatokrit

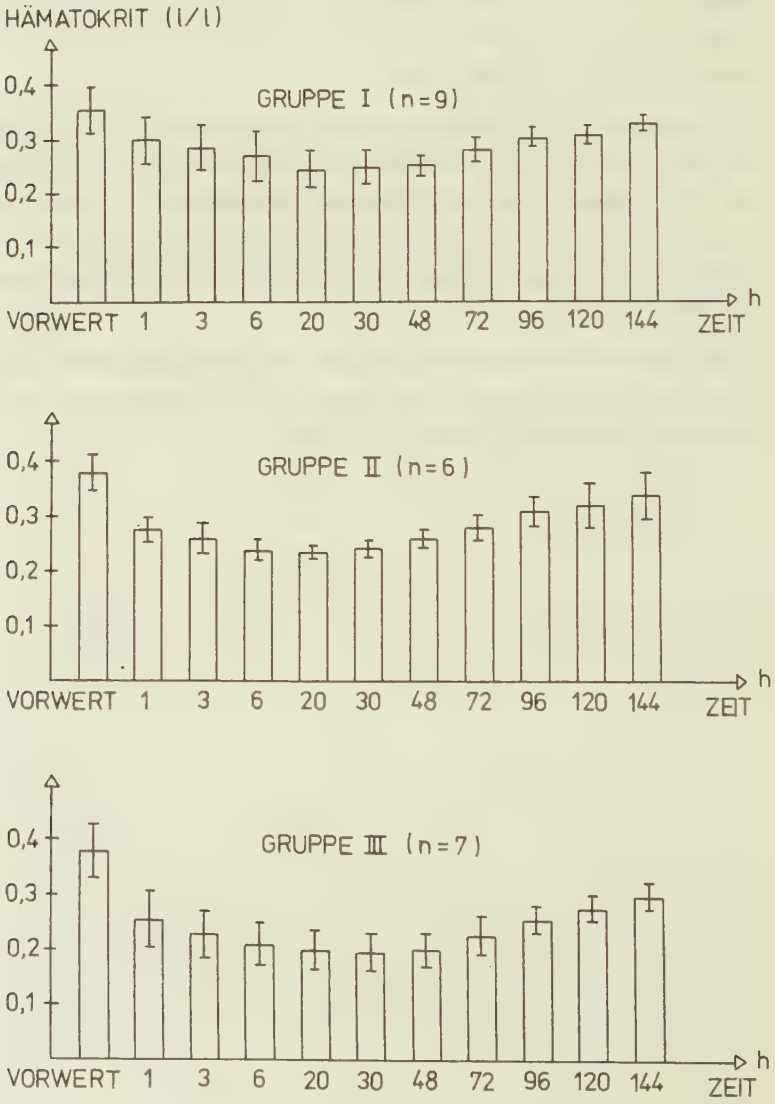
Die Veränderungen des Hämatokrits ergeben sich aus Abb. 8. Der mittlere Hämatokrit in den Gruppen zu Versuchsbeginn lag bei

Gruppe I (n = 9) 0,35 ± 0,04 l/l
Gruppe II (n = 6) 0,38 ± 0,03 l/l
Gruppe III (n = 7) 0,38 ± 0,05 l/l

Die Veränderungen des Hämatokrits nach dem Blutentzug waren durch eine signifikante Abnahme nach einer Stunde gekennzeichnet (Gruppe I $p < 0,02$, Gruppe II $p < 0,001$, Gruppe III $p < 0,001$). Der Abfall erreichte nach 20 Stunden in der Gruppe I mit 0,24 ± 0,04 l/l und in der Gruppe III mit 0,24 ± 0,01 l/l seinen Tiefpunkt; in der Gruppe III erst nach 30 Stunden mit 0,19 ± 0,04 g/l (Gruppe I, II und III $p < 0,001$).

Bis zum Ende des Versuchszeitraumes stieg der Hämatokrit kontinuierlich an, erreichte aber in keiner Gruppe den Ausgangswert. In Gruppe III bestand noch ein signifikanter Unterschied zum Vorwert ($p < 0,005$).

Abb. 8: Hämatokrit vor und nach Hämorrhagie



7. Blutdruckwerte vor und nach der Hämorrhagie in der Gruppe III

Die Veränderungen des Blutdruckes in der Gruppe III sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Der basale systolische Blutdruck an der zentralen Ohrarterie der Kaninchen betrug 12,0 ± 1,2 kPa. Er lag damit im oberen Bereich der Angaben anderer Autoren (12, 71), die nach der Methode von GRANT und ROTHSCHILD oder mit einem Statham-Element (33) gemessen haben.

Direkt nach der Hämorrhagie fiel der Blutdruck auf 11,06 ± 1,47 kPa und erreicht seinen Tiefpunkt nach drei Stunden mit 10,13 ± 1,6 kPa, aber kein Wert unterschied sich signifikant vom Kontrollwert ($p > 0,05$). Im weiteren Verlauf stieg der Blutdruck mit gewissen Schwankungen wieder an, und erreichte den Ausgangswert nach 96 Stunden wieder.

Tab. 2:

Vorwert	12,0 ± 1,2 kPa	(90 ± 9 mmHg)
Direkt nach der Hämorrhagie	11,06 ± 1,47 kPa	(83 ± 11 mmHg)
1h	10,4 ± 1,07 kPa	(78 ± 8 mmHg)
3h	10,13 ± 1,6 kPa	(76 ± 15 mmHg)
6h	10,8 ± 0,93 kPa	(81 ± 7 mmHg)
20h	11,33 ± 0,93 kPa	(85 ± 7 mmHg)
30h	10,66 ± 0,8 kPa	(80 ± 6 mmHg)
48h	10,93 ± 1,33 kPa	(82 ± 10 mmHg)
96h	11,86 ± 1,2 kPa	(89 ± 9 mmHg)
144 h	11,6 ± 1,33 kPa	(87 ± 10 mmHg)

Legende zu Tabelle 2: Serienmessungen des Blutdrucks für Gruppe III (Sondergruppe) vor und nach Blutentzug von 21,5 ml/kg. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Anzahl der Versuchstiere n = 5.

IV. DISKUSSION

Reninsubstrat, Renin und Hämorrhagie

Angiotensinogen ist ein hepatisch synthetisiertes Glycoprotein, das in den letzten Jahren eingehender untersucht worden ist. Es existieren im Gegensatz zu früheren Angaben (19, 67) im Plasma des Menschen multiple Formen von Angiotensinogen (41, 55). Die Plasmakonzentration wird durch mehrere Faktoren bestimmt:

1. Seine hepatische Bildungsrate
2. Die Degradation durch Renin.

Der Abfall der Substratkonzentration bei hepatozellulären Leberschädigungen ist eindrucksvoll bei Versuchen an isolierten Rattenlebern gezeigt worden (6) und kann indirekt aus der Substratkonzentrationserniedrigung im menschlichen Plasma bei Leberschädigungen gefolgert werden (5, 73, 74). Dabei ist der Substratabfall im Plasma ausgeprägter, je schwerer der Leberprozeß ist. Excessive Reninspiegelerhöhungen können eine Substratabnahme allein durch eine Verbrauchsreaktion mit konsekutiver Bildung von Angiotensin I/II auslösen (48). Eine Kombination von hohem Reninspiegel und hepatozellulären Schädigungen führt demgemäß zu den stärksten Substraterniedrigungen, wie sie bei fulminanter Leberinsuffizienz beim Menschen beschrieben wurden (5).

Als bemerkenswertes Resultat dieser Versuche zeigt sich, daß es in Abhängigkeit von der Schwere der Hämorrhagie zu charakteristischen, phasenhaften Veränderungen der PRSC kommt. Für alle drei Tiergruppen ist ein Abfall der PRSC von ca. 10-20 Prozent zum Zeitpunkt eine Stunde nach der Entblutung nachweisbar, gefolgt von erhöhten Konzentrationen ab der sechsten Stunde nach der Entblutung, mit einem Konzentrationsgipfel nach ca. 20 Stunden. Die Tiergruppe mit einem 40prozentigen Blutentzug reagiert zu diesem Zeitpunkt mit einem PRSC-Anstieg auf 304 Prozent. 30prozentiger Blutverlust bewirkt eine Angiotensinogenzunahme auf 153 %, bei 20prozentigem Blutverlust ergibt sich ein Substratanstieg auf 123 %. Der Angiotensinogenanstieg in der Posthämorrhagiephase bildet sich in Gruppe III auch innerhalb von sechs Tagen nicht vollkommen zur Norm zurück. Ebenfalls findet sich in Gruppe II lediglich eine Annäherung an die Norm. In Gruppe I liegt die PRSC da-

gegen nach 72 Stunden im Normbereich.

Wie läßt sich dieses bemerkenswerte und in zweifelsfreier Abhängigkeit zur Größe des Blutentzugs auftretende Verhalten in Zusammenhang mit der Regulation der Biosynthese von Angiotensinogen und den parallelen Veränderungen der Reninsekretion deuten?

Die durch den stärkeren Blutverlust verursachten Änderungen der Hämodynamik bedingen infolge Hypovolämie und Blutdruckhypotonie eine Hypoperfusion zahlreicher Gewebe, einschließlich der Nierenstrombahn (76). Hypovolämie jeder Genese führt obligat zur Aktivierung zahlreicher neurohormonaler Systeme, die im Dienste der Kreislaufhomöostase stehen. So ist eine Stimulierung des sympathikoadrenalen Systems (22, 34, 69, 76), der Glucocorticoide via ACTH (25, 26, 27, 54, 70) und des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (3, 7, 11, 22, 34, 42, 50, 63, 71) bekannt.

Die Hyperreninämie (PRC-Anstieg) entwickelt sich in unseren Versuchen rasch und ist nach einer Stunde in Gruppe III ca. sechsfach, in Gruppe II vierfach, in Gruppe I 2,4-fach gegenüber dem Ausgangswert erhöht.

Da wie eingangs betont, eine Stimulierung von Renin zu einem Substratverbrauch führt, kann angenommen werden, daß neben der Hämodilution eine gesteigerte Substratkonsumption durch Renin für den initialen Abfall des Plasmaangiotensinogenspiegels mitverantwortlich ist.

Untersuchungen über die Bedeutung einer erhöhten Reninsekretion für die Substratkonsumption sind in der Literatur nicht einheitlich: TATEISHI et al. (66) registrierten an der Ratte keine signifikante Änderung der PRSC bei Anstieg der PRC auf das Doppelte. NASJLETTI and MASSON (48) erhöhten die Plasmareninkonzentration durch Renininjektionen auf das 14fache und fanden eine Abnahme der PRSC von 355 auf 106 ng AT/ml. CARRETERO und GROSS (13) konnten bei mittleren Dosen von Renin sogar einen Anstieg, bei hohen Renindosen eine unveränderte Substratkonzentration an der Ratte registrieren.

Ganz ohne Zweifel sind die Veränderungen der Plasmasubstratkonzentration, auch in der Initialphase, durch die Änderung der hepatischen Syntheserate mitbestimmt Dies ergibt sich aus folgendem: Während die Substratkonzentration nach 6 Std. ansteigt, ist die Reninkonzentration, vor allem in der Gruppe III noch stark erhöht (Abb. 11). Durch die Aktivierung hormonaler Systeme wird offensichtlich rasch

eine Stimulation der hepatischen Biosynthese von Angiotensinogen ausgelöst, die die Neusynthese anderer Plasmaproteine offenbar bei weitem übertrifft (72). Es ist nämlich zu registrieren, daß die Proteinkonzentration im Plasma, die normalerweise über 50 % von Albuminen getragen wird, sich nur zögernd wieder auf die Ausgangskonzentration hin bewegt (Abb. 7).

Für die Stimulation der hepatischen Biosynthese kommen nach neueren Befunden mehrere Wirkstoffe in Betracht:

NASJLETTI und MASSON (48) konnten feststellen, daß Angiotensin II-Infusion bei der Ratte einen Anstieg der PRSC auslöst. Auch KHAYYALL and al. (39) haben diesen Befund bestätigen können. Des weiteren fanden BLAIR-WEST et al. (8) sechs Stunden nach Angiotensin II-Infusion bei Hunden eine Substratkonzentrationszunahme um 50 %. Dies entsprach dem Substratanstieg, den wir in unserer Gruppe III im selben Zeitabstand gemessen haben.

Auch unter den Bedingungen der hämorrhagischen Hypotension wurde eine Angiotensin II-Plasmakonzentrationszunahme bei direkter Messung nachgewiesen (61, 75). Die Bedeutung von Angiotensin II für die Substratbiosynthese nach größerem Blutverlust wurde durch die Versuche von BEATY et al. (3) an Hunden bestätigt.

Sie fanden im Verlauf der hämorrhagischen Hypotension und in der Schockphase eine unveränderte PRSC. Zusätzliche Gabe eines Angiotensin II-Antagonisten führte unter den gleichen Versuchsbedingungen zu einem Abfall, Angiotensin II-Zufuhr zu einem Anstieg der Substratkonzentration.

Interessanterweise besitzt auch Angiotensin I die Fähigkeit an der isolierten perfundierten Leber die Substratsynthese zu stimulieren, der Effekt ist jedoch schwächer als der von Angiotensin II (48). Exogen zugeführtes Renin vermag ebenfalls die Substratbildung in der Leber anzuregen (48).

Neben der vermuteten Wirkung von Angiotensin II auf die Leberzelle muß des weiteren ein Effekt von Glucocorticoiden angenommen werden. Zwischen diesen beiden Hormonen bestehen Zusammenhänge in ihrer Wirkung auf die PRSC, die im einzelnen noch nicht geklärt sind.

So führte Angiotensin II-Infusion bei Hunden nicht nur zu einem PRSC-Anstieg, sondern gleichzeitig zu einer Zunahme der Plasma-Corticosteroide (8). Die Reaktion des Reninsubstrats auf die AT-II-Infusion war jedoch nicht von einer erhöhten

Glucocorticoidsekretion abhängig, wie es bei hypophysektomierten Hunden mit ausreichender Cortisolsubstituion nachgewiesen wurde (58).

Hämorrhagie ist ein außerordentlich starker Stimulus der Cortisolsekretion (25, 26, 27, 54, 70) und Glucocorticoide sind bereits seit langem als Stimulatoren der Biosynthese von Proteinen in der Leberzelle bekannt (17, 35, 36, 37). Der gleiche Effekt auf Angiotensinogen ist bei Ratten an der in vitro perfundierten Leber (30), an inkubierten Leberschnitten (23) wie auch an isolierten Leberzellen beschrieben worden (20, 72).

Es ist weitgehend gesichert, daß auch andere Streßsituationen die Nebennierenaktivität steigern. Da wir im Anschluß an die Hämorrhagie den Eindruck einer verminderten Nahrungsaufnahme bei den Kaninchen hatten, ohne dies genau bilanziert zu haben, führten wir einen zusätzlichen Versuch durch, um einen eventuellen Einfluß des Fastens als Streß auf die Substratproduktion zu dokumentieren.

Interessanterweise bestätigte sich ein früherer Befund (49), der bei dreitägigem Futterentzug über einen Anstieg der PRSC an Kaninchen berichtete. Unser Substratmittelwert von vier weiblichen Tieren stieg 24 Stunden nach Nahrungsentzug signifikant von 534 + 92 ng AT I/ml auf 795 + 126 ng AT I/ml ($p < 0,02$) und nach drei Tagen auf 942 + 162 ng AT I/ml ($p < 0,005$) an. Einen Tag nach Wiederfütterung fiel die PRSC auf 760 + 159 ng AT I/ml und hatte sich nach fünf Tagen mit 550 ± 27 ng AT I/ml wieder normalisiert. Die PRC blieb während des gesamten Zeitraums unverändert. Bedauerlicherweise mißlangen Cortisolbestimmungen, die einen Zusammenhang zwischen dieser katabolen Streßsituation und einer erhöhten Glucocorticoidsekretion hätten belegen können. Entsprechende Untersuchungen in der Literatur ergeben kein einheitliches Bild. Unter Nulldiät wird sowohl von unveränderten (2, 9, 14, 40) als auch erhöhten (16, 24, 43, 52) Cortisolwerten im Plasma bzw. Urin beim Menschen und mehreren Tierspezies berichtet. Ebenso führt Mangelernährung (1, 56) bzw. niedrige Kaloriendiät (59) auf der einen Seite zu einem Plasma-Cortisolanstieg, während eine andere Autorengruppe (51) erhöhte Werte bei Mangelernährung an Kindern nur registriert, wenn zusätzliche Streßfaktoren wie Infektion, Hypothermie, Hypoglykämie und Azidose auftreten.

Beim Literaturvergleich zwischen einer Hämorrhagie und totalem Fasten erscheint der Blutverlust als ein entscheidender Stimulus für die Glucocorticoidsekretion, da dieser Befund eindeutig gesichert ist (25, 26, 27, 54), während die Veränderungen der Glucocorticoide unter Nahrungsentzug nur mäßig und weniger einheitlich beschrieben werden (2, 9, 14, 16, 24, 40, 43, 52).

Zusammengefaßt ist demnach folgendes anzunehmen: Die durch die arterielle Hypotension ausgelöste Stimulation der Reninsekretion mit konsekutiver AT II-Spiegeler-

höhung und der gleichzeitige Cortisolanstieg rufen offensichtlich eine langanhaltende Steigerung der Substratsynthese hervor. Das Bemerkenswerte der Versuchsresultate liegt darin, daß die erhöhte Angiotensinogenkonzentration über einen längeren Zeitraum bestehen bleibt, währenddessen die, zur Auslösung dieses Effektes notwendigen Stimuli entweder nur mehr schwach oder überhaupt nicht mehr wirksam sind. Als Beweis hierfür kann man ansehen, daß die Corticoidspiegel nach einem größeren Blutverlust meist innerhalb 24 Stunden wieder zur Norm zurückkehren (54). In unseren Versuchen war eine Analyse des Plasma-Cortisols bzw. von Corticosteron nicht möglich. Was eine Gegenüberstellung unserer Versuche mit denen der Literatur betrifft, so ist der durch Hämorrhagie verursachte Reninanstieg ein genereller Befund (3, 7, 11, 22, 34, 42, 50, 63, 71),sowohl an Hunden, Katzen und Kaninchen, der sich aber in quantitativer Hinsicht unterscheidet, nicht zuletzt durch differierende Entnahmezeiten. So sind die PRA-Anstiege bei Kaninchen (42, 71) bzw. PRC-Werte bei Katzen (22) mit geringerem Blutverlust höher, während sie bei Hunden (7, 11) mit vergleichbarer Blutentnahme geringer sind. 10prozentiger Blutverlust beim Menschen bleibt ohne Einfluß auf die Reninsekretion (7, 28). In Bezug auf die Veränderungen der Plasma-Angiotensinogenkonzentrationen nach größerem Blutverlust, gehen die Ergebnisse in der Literatur weit auseinander.

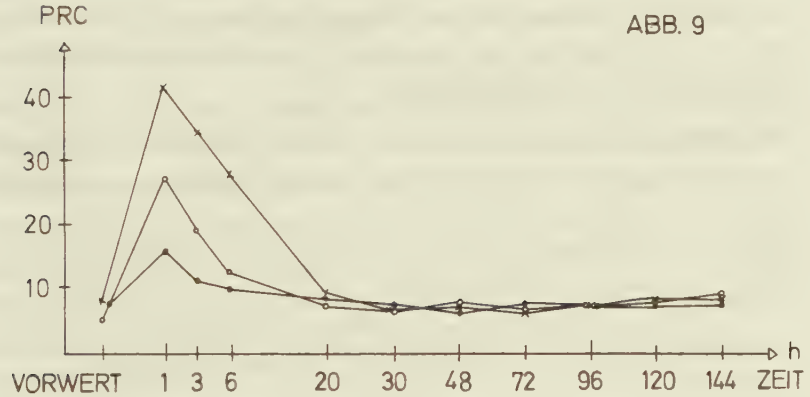
So finden BEATY et al. (3) bei stufenweisem Abfall des Blutdrucks auf 6,67 kPa (50 mmHg) eine kräftige Reninzunahme nach ca. vier Stunden, bei unveränderten Renin-Substratkonzentrationen. Zu demselben Resultat bei einer Hämorrhagie von 20 ml/kg gelangen BLAINE et al. (7) nach 90 Min.. Dies entspricht unseren Ergebnissen, da nach diesem Zeitabstand der Substratspiegel durch Neosynthese noch nicht angestiegen sein kann (8) und erst der 20-Stundenwert in unserer Gruppe III signifikant erhöht ist. DEXTER et al. (18) finden im hämorrhagischen Schock teilweise extrem niedrige Angiotensinogenkonzentrationen. Bei COLLINS und HAMILTON (15) zeigt sich bei 10 von 15 Hunden ein Abfall von Renin-Substrat unter hämorrhagischer Hypotension. Dauer und Stärke der Hypotension variieren deutlich bei den Einzeltieren und sind nicht exakt festzulegen. In der Frühphase der Hämorrhagie beobachten die letztgenannten Autoren einen vorübergehenden Anstieg von Renin-Substrat. Ein ähnlicher Anstieg wird zusätzlich bei zwei Hunden 20 Stunden nach einem einmaligen Blutverlust von 20-25 ml/kg gefunden. Dies entspricht dem Zeitraum, in dem wir das Maximum der PRSC finden.

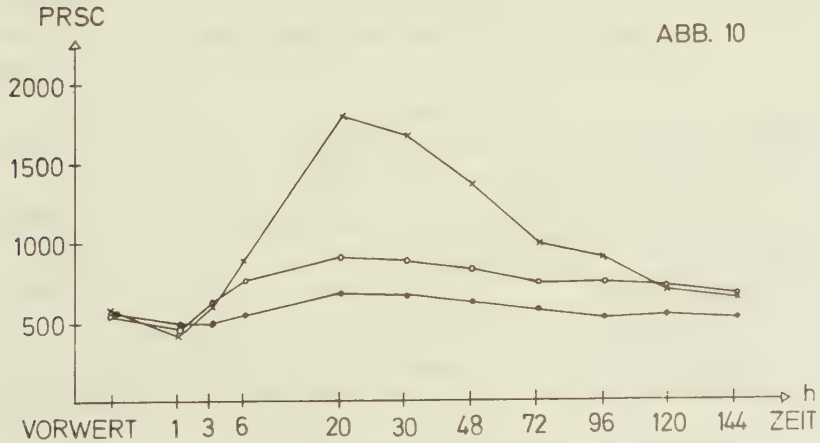
Unsere Untersuchungen belegen, daß der unter quantitativen Aspekten stärkere Blutverlust mit entsprechend stärker ausgeprägten Veränderungen der Reninsekretion wie auch regulativen Veränderungen von Angiotensinogen verknüpft ist (Abb.9 und 10).

Abb. 9: Auswirkung steigender Blutverluste auf die PRC (ng AT I/ml/30 min.).

Abb. 10: Auswirkung steigender Blutverluste auf die PRSC (ng AT I/ml).

Aus Gründen der Übersicht sind nur die Mittelwerte dargestellt.
(Gruppe I = —●—●— 10,6 ml/kg; Gruppe II = —o—o— 16,4 ml/kg;
Gruppe III = —×—×— 21,6 ml/kg Blutverlust)





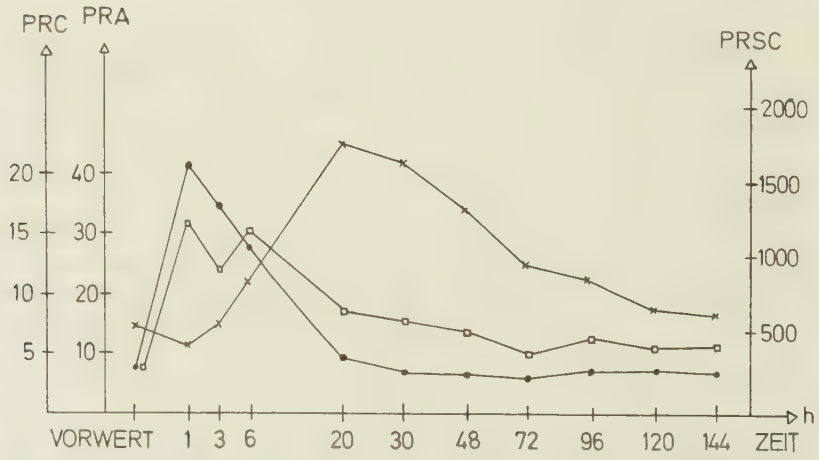
Vergleich Plasma-Renin-Konzentration und Plasma-Renin-Aktivität

Zur Frage, ob Messungen der PRC oder Messungen des PRA vorteilhafter zur Charakterisierung der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems herangezogen werden können, ist folgendes anzuführen:

PRA-Bestimmungen fußen auf der Umsetzung von endogenem Renin mit endogenem Substrat. Bei gleichen Enzym (Renin)-Gehalt führen niedrige Substratkonzentrationen im Ansatz zu geringeren, hohe Substratkonzentrationen dagegen zu erhöhter Angiotensinfreisetzung. Substratunabhängige Messungen der Plasma-Renin-Konzentration unter Zusatz von homologen oder heterologen Angiotensinogenen (im Überschuß) reflektieren stets die renale Reninsekretion.

Der Vergleich Plasma-Renin-Aktivität und Plasma-Renin-Konzentration in Gruppe III ergibt erwartungsgemäß bei erhöhten Angiotensinogenspiegeln in der posthämorrhagi-

Abb. 11: Vergleich PRA (—□——□—), PRC (—●——●—) und PRSC (—×——×—) in Gruppe III nach Hämorrhagie.
(PRC in ng AT I/ml/30 min., PRA in ng/ATI/ml/h, PRSC ngAT I/ml. Aus Gründen der Übersicht sind nur die Mittelwerte dargestellt).



schen Phase, daß vergleichsweise höhere PRA-Werte gemessen werden (Abb. 11). Aus der Literatur geht hervor, daß z.B. eine Dissoziation zwischen PRC und PRA unter adrenaler Insuffizienz bei anschließender Behandlung mit Steroiden durch die Änderungen der PRSC verursacht sind (57). Das bedeutet, daß PRA-Messungen unter unseren Versuchsbedingungen eine verläßlichere Kenngröße des gesamten Renin-Angiotensin-Systems darstellen. Da hohe exogene Angiotensin-II-Spiegel die Reninsekretion herabsetzen (68), kann gefolgert werden, daß die "normalen" PRC-Werte, vor allen in Gruppe III zu Zeitpunkten stark erhöhter Angiotensinogenkonzentration zu einer renalen Hemmung der Reninsekretion führen. Beurteilt an der PRA muß demnach auch in der posthämorrhagischen Phase in Gruppe III eine Aktivierung des RAS angenommen werden.

Zusammengefaßt ist damit die Messung des PRA auch unter unseren Bedingungen als ein zuverlässigerer Indikator dieses biologisch bedeutsamen Pressorsystems anzusehen.

Übertragen auf Substratmangelzustände beim Menschen, z.B. im hämorrhagischen Schock, kann aus den Versuchen abgeleitet werden, daß die Zufuhr von Angiotensinogen in Form von Frischplasma vorteilhaft sein kann, um durch ein ausreichendes Substratangebot die Blutdruck- und Kreislaufregulation zu verbessern. Arterielle Hypotonie beim Menschen mit fulminanter Lebernekrose ist mit einem signifikant erniedrigten Reninsubstrat (RS) korreliert (5) und kann bei galaktosaminiduzierter Lebernekrose an Meerschweinchen durch RS- angereichertes Plasma rasch normalisiert werden (10). So konnte auch die Anwendung von gefrorenem Frischplasma ein Defizit von RS bei Leberzirrhose zumindestens teilweise korrigieren (4).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Veränderungen der Plasma-Renin-Konzentration (PRC), der Plasma-Renin-Substrat-Konzentration (PRSC) und teilweise der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) bei 20prozentigem (10,6 ml/kg), 30prozentigem (16,4 ml/kg) und 40prozentigem (21,4 ml/kg) Blutverlust an Kaninchen gemessen. Der posthämorrhagische Kontrollzeitraum umfaßte sechs Tage. Die Bestimmung der PRC, PRSC und PRA erfolgt radioimmunologisch.

Trotz differenter Blutentnahmen kam es in allen Gruppen zu einem raschen Anstieg der PRC und dem höchsten Wert nach einer Stunde. Zwischen der Zunahme der PRC und der Größe des Volumenverlustes bestand eine enge lineare Abhängigkeit. Hämorrhagie von 20 Prozent bewirkte einen 2,4fachen, von 30 Prozent einen vierfachen und von 40 Prozent einen sechsfachen Anstieg der PRC. Daran anschließend erfolgte ein gleichmäßiger Abfall und nach 20 Stunden bewegte sich die PRC im Bereich der Ausgangswerte.

Die Änderungen der PRSC unter diesen Versuchsbedingungen verliefen annähernd entgegengesetzt. So fiel die Substratkonzentration in der ersten posthämorrhagischen Stunde in allen Gruppen um 10 - 20 Prozent, stieg im weiteren Verlauf, überschritt die Normalwerte nach sechs Stunden und erreichte einen Konzentrationsgipfel nach 20 Stunden. Dabei erfolgte der Anstieg von Reninsubstrat bei 40prozentigem Blutverlust überproportional auf 304 Prozent gegenüber den geringeren Blutentnahmen mit einer Steigerung auf 153 bzw. 123 Prozent. Als Faktoren für die Stimulierung der Substratneosynthese müssen erhöhte Angiotensin II- und Glucocorticoidspiegel als Folge des Blutverlustes angesehen werden. Bemerkenswerterweise tendierten die erhöhten Substratkonzentrationen bei größerem Blutverlust erst ab 72 Stunden wieder auf die Normalwerte hin.

Bei einer Vergleichsbestimmung PRA und PRC hat sich herausgestellt, daß zwischen beiden Kenngrößen des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), in Abhängigkeit von der PRSC, erwartungsgemäß Differenzen bestehen. PRA-Bestimmungen sind zur Erfassung der Funktion des RAS aussagekräftiger als Renin-Konzentrationsmessungen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEYNE, G.A.O. and V.H. YOUNG:
Adrenocortical Function in Children With Severe Protein-Calorie Malnutrition.
Clin. Sci. 33, 189-200 (1967)

2. ATHANASION, V.N. and R.W. PHILLIPS:
Effects of Fasting on Plasma Metabolites and Hormones in Lactating Dairy Cows.
Am. J. Vet. Res. 39 (6) 957-960 (1978)

3. BEATY III. O., Ch. H. SLOOP, H.E. SCHMID Jr. and V.M. BUCKALEW Jr.:
Renin Response and Angiotensinogen Control During Graded Hemorrhage and Shock in the Dog.
Am. J. Physiol. 231 (4) 1300-1307 (1976)

4. BERKOWICZ, H.D.:
Renin Substrate in the Hepatorenal Syndrome. In The Kidney in Liver Disease. Edited by Murray Epstein. Elsevier.
p 254-270 (1978)

5. BERNARDI, M., S.P. WILKINSON, H. WERNZE, H.J. SPECH, G.MÜLLER, L. POSTEN and R. WILLIAMS:
The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Fulminant Hepatic Failure.
Gastroenterology 1979 (in Druck)

6. BEYER, J.C.C., H. WERNZE, H. GALLENKAMP:
Angiotensinogensyntheserate der isoliert perfundierten Rattenleber bei experimenteller Leberschädigung.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 81, 1339 (1975)

7. BLAINE, E.H., J.O. DAVIS and R.T. WITTY:
Renin Release after Hemorrhage and after Suprarenal Aortic Constriction in Dogs Without Sodium Delivery to the Macula Densa.
Circ. Res. 27, 1081-1089 (1970)

8. BLAIR-WEST, J.R., I.A. REID and W.F. GANONG:
Regulation of Renin-Substrate.
Mechanisms of Hypertension, 1973, Editor M.P. Sambhi

9. BOULTER, P.R., R.F. SPARK and R.A. ARKY:
Dissociation of the Renin-Aldosterone System and Refractoriness to the Sodium-Retaining Action of Mineralocorticoid During Starvation in Man.
J. clin. endocrinol. metabol. 38, 248-254 (1974)

10. BRACHTEL, D., H. WERNZE:
Arterielle Hypotension und Renin-Angiotensin-System bei experimenteller Leberdystrophie.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., p 207-209 (1974)

11. BROWN, J.J., D.L. DAVIES, A.F. LEVER, J.I.S. ROBERTSON and A. VERNIORY:
The Effect of Acute Hemorrhage in the Dog and Man on Plasma Renin Concentration.
J. Physiol. 182, 649-663 (1966)

12. CAMPELL, D.H., S.L. SKINNER and A.J. DAY:
Cellophane Perinephritis Hypertension and its Reversal in Rabbits.
Effect on Plasma Renin, Renin Substrate and Renal Mass
Circ. Res. 33, 105-112 (1973)

13. CARRETERO, O. and F. GROSS:
Evidence for Humoral Factors Participating in the Renin-Substrate Reaction.
Circ. Res. 20 and 21 Suppl. II 115-126 (1967)

14. CHINN, R.H., J.J. BROWN, R. FRASER, S.M. HERON, A.F. LEVER, L. MURCHISON and J.S. ROBERTSON:
The Natriuresis of Fasting: Relationship To Changes In Plasma Renin And Plasma Aldosterone Concentrations.
Clin. Sci. 39, 437-455 (1970)

15. COLLINS, D.A. and A.S. HAMILTON:
Changes in the Renin-Angiotensin System in Hemorrhagic Shock.
Am. J. Physiol. 140, 499-512 (1944)

16. COPINSCHI, G., M.H. De LAET, J.P. BRION, R. LECLERCQ, M. L'HERMITE, C. ROBYN, E. VIRASORO and E. VAN CAUTER:
Simultaneus Study of Cortisol, Growth Hormone and Prolactin. Nyctohemeral Variations in Normal and Obese Subjects. Influence of Prolonged Fasting in Obesity.
Clin. Endocrinol. 9, 15-26 (1978)

17. CRANE, L.J. and D.L. MILLER:
Synthesis and Secretion of Fibrinogen and Albumin by Isolated Rat Hepatocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60 (4), 1269-1277 (1974)

18. DEXTER, L., H.A. FRANK, F.W. HAYNES and M.D. ALTSCHULE:
Traumatic Shock: VI
The Effect of Hemorrhagic Shock on the Concentration of Renin and Hypertensinogen in the Plasma of Dogs.
J. clin. Invest. 22, 847-852 (1943)

19. EGGENA, P., C.L. CHU, J.D. BARRETT and M.P. SAMBHI:
Purification and Partial Characterisation of Human Angiotensinogen.
Biochim. Biophys. Acta, 427, 208-217 (1976)

20. FALGE, C.:
Zur Angiotensinogenbiosynthese in isolierten Leberzellen.
Inaug. Diss. Würzburg (1976)

21. Federation of American Societies for Experimental Biology in Biology Data Book Volume III.
Second Edition 1974

22. FEUERSTEIN, G., P. BOONYAVIROJ and Y. GUTMAN:
Renin-Angiotensin Mediation of Adrenal Catecholamine Secretion Induced by Hemorrhage.
Eur. J. Pharmacol. 44 (2), 131-142 (1977)

23. FREEMAN, R.H. and H.H. ROSTORFER:
Hepatic Changes in Renin Substrate Biosynthesis and Alkaline Phosphatase Activity in the Rat.
Am. J. Physiol. 223, 364-370 (1972)

24. GALVAO-TELES, A., L. GRAVES, C.W. BURKE, K. FOTHERBY and R. FRASER:
Free Cortisol in Obesity, Effect of Fasting.
Acta Endocrinol. 81, 321-329 (1976)

25. GANN, D.S.:
Parameters of the Stimulus Initiating the Adrenocortical Response to Hemorrhage.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 156, 740-755 (1969)

26. GANN, D.S. and J.C. PIRKLE:
Role of Cortisol in the Restitution of Blood Volume after Hemorrhage.
Am. J. Surg. 130: 565-569 (1975)

27. GANN, D.S., G.L. CRYER and J.C. PIRKLE:
Physiological Inhibition of Facilitation of Adrenocortical Response to Hemorrhage.
Am. J. Physiol. 232 (1): R_5 - R_9 (1977)

28. GOETZ, K.L., G.C. BOND and W.E. SMITH:
Effect of Moderate Hemorrhage in Humans on Plasma ADH and Renin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 277-280 (1974)

29. GRANT, R.T. and P. ROTHSCHILD:
A Devise for Estimating Blood Pressure in the Rabbit.
J. Physiol. 81, 265 (1934)

30. HASEGAWA, H., A. NASJLETTI, K. RICE and G.M.C. MASSON:
Role of Pituitary and Adrenals in the Regulation of Plasma Angiotensinogen.
Am. J. Physiol. 225 (1) 1-6 (1973)

31. HIRASAWA, K., H. YAMAMOTO, A. MATSUI, K. SHINOZAKI,
S. KOBAYASHI, Y. YAGI, S. MORIMOTO R. TAKEDA and M. MURAKAMI:
The Effect of Mercuric Chlorid, of bilateral Ureteral Ligation and of Bilateral Nephrectomie in Plasma Substrate Concentration in Rats.
Jap. Circ. J. 32, 1591-1595 (1968)

32. HIWADA, K., K. NISHIMURA and T. KOKUBU:
Changes of Plasma-Renin Substrate Concentration in Rats under Various Experimental Conditions.
Jap. Circ. J. 40 (8) 945-946 (1976)

33. ICHIKAWA, S., J.A. JOHNSON, W.L. FOWLER Jr., Ch.G. PAYNE,
K. KURZ and W.F. KEITZER:
Pressor Responses to Norepinephrine in Rabbits with 3 Day and 30 Day Renal Artery Stenosis: The Role Of Angiotensin II.
Circ. Res. 43 (3), 437-446 (1978)

34. JAKSCHIK, B.A., G.R. MARSCHALL, J.L. KOURIK and P. NEEDLEMAN:
Profile of Circulating Vasoactive Substances in Hemorrhagic Shock and Their Pharmacologic Manupulation.
J. clin. Invest. 54, 842-852 (1974)

35. JEEJEEBHOY, K.N., A. BRUCE-ROBERTSON, J. HO and U. SODTKE:
The Effect of Cortisol on the Synthesis of Rat Plasma Albumin, Fibrinogen and Transferrin.
Biochem. J. 130, 533-538 (1972)

36. JEEJEEBHOY K.N., J. HO, G.R. GREENBERG, M.J. PHILLIPS, A. BRUCE-ROBERTSON and U. SODTKE:
Albumin, Fibrinogen and Transferrin-Synthesis in Isolated Rat Hepatocyte Suspensions.
Biochem. J. 146, 141-155 (1975)

37. JOHN, D.W. and L.L. MILLER:
Regulation of Net Biosynthesis of Serum Albumin und Acute Phase Plasma Proteins.
J. Biol. chem. 244, 6134-6142 (1969)

38. JOHNSON, M.D. and R.L. MALVIN:
Plasma Renin Activity During Pentobarbital Anaesthesia and graded Hemorrhage in Dogs.
Am. J. Physiol. 229 (4) 1098-1101 (1975)

39. KHAYYALL, M., J. MAC GREGOR, J.J. BROWN, A.F. LEVER and J.I.S. ROBERTSON:
Increase of Plasma Renin Substrate Concentration After Infusion of Angiotensin in the Rabbit.
Clin. Sci. 44, 87-90 (1973)

40. KOLANOWSKY, J., M.A. PIZARRO, M. DE GASPARO, P. DESMECHT, C. HARVENGT and J. CRABBE:
Influence of Fasting on Adrenocortical and Pancreatic Islet Response to Glucose Loads in the Obese.
Europ. J. clin. Inves. 1, 25-31 (1970)

41. LENTZ, K.E., F.E. DORER, J.R. KAHN, M. LEVINE and L.T. SKEGGS:
Multiple Forms of Renin Substrate in Human Plasma.
Clin. Chim. acta 83 (3) 249-257 (1978)

42. MC KENZIE, J.K., M.R. LEE and W.F. COOK:
Effect of Hemorrhage on Arterial Plasma Renin Activity in the Rabbit.
Circ. Res. 19, 269-273 (1966)

43. MLEKISCH, W., W. TRUPPE, W. BEYER and B. PALETTA:
The Effect of Hunger on Free Fatty Acid and Corticosterone Plasma Levels in Rats.
Experimentia 31 (10), 1135-1137 (1975)

44. MORRIS, B.J., J.O. DAVIS, M.L. ZATZMANN and G.M. WILLIAMS:
The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Rabbits with Congestive Heart Failure Produced by Aortic Constriction.
Circ. Res. 40, 275-282 (1977)

45. NASJLETTI, A. and G.M.C. MASSON:
Effects of Corticosteroids on Plasma Angiotensinogen and Renin Activity.
Am. J. Physiol. 217, 1396-1400 (1969)

46. NASJLETTI, A. and G.M.C. MASSON:
Hepatic origin of Renin Substrate.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 49: 931-932 (1971)

47. NASJLETTI, A. and G.M.C. MASSON:
Studies on Angiotensinogen Formation in a Liver Perfusion System.
Circ. Res. Suppl. II, 30 and 31: 187-198 (1972)

48. NASJLETTI, A. and G.M.C. MASSON:
Stimulation of Angiotensinogen Formation by Renin and Angiotensin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 307-310 (1973)

49. NOCENTI, M.R., S. SIMCHON and L.J. CIZEK:
Analysis of the Renin-Angiotensin System During Fasting in Adult Male Rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150, 142-147 (1975)

50. OTSUKA, K., T.A. ASSAYKEEN, W.F. GANONG and W.H. TU:
Effect of Nephrectomy and Low Sodium Diet On The Increase In Plasma Renin Levels Produces By hemorrhage.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 704-707 (1968)

51. PAISY, R.B., M. ANGERS and S. FRENK:
Plasma Cortisol Levels in Malnourished Children With and Without Superimposed Acute Stress.
Arch. Dis. Childh. 48, 714-716 (1973)

52. PALMBLAD, J., L. LEVI, A. BURGER, A. MELANDER, U. WESTGREN, H. von SCHENCK and G. SKUDE:
Effects of Total Energy Withdrawal (Fasting) on the Levels of Growth Hormone, Thyrotropin, Cortisol, Adrenaline, Noradrenaline, T_4, T_3 and rT_3 in Heathy Males.
Acta Med. Scand. 201, 15-22 (1977)

53. PETTINGER, W.A., M. MARCHELLE and L. AUGUSTO:
Renin Suppression by DOC and NaCL in the Rat.
Am. J. Physiol. 221, 1071-1074 (1971)

54. PIRKLE, J.C. and D.S GANN:
Restitution of Blood Volume after Hemorrhage, Role of the Adrenal Cortex.
Am. J. Physiol. 230 (6) 1683-1687 (1976)

55. PRINTZ, M.P., J.M. PRINTZ and R.T. DWORSCHACK:
Human Angiotensinogen
Purification, Partial Characterisation and an Comparison with Animal Prohormones.
J. Biol. chem. 252 (5) 1654-1662 (1977)

56. RAO, K.S.J., S.G. SRIKANTIA and C. GOPALAN:
Plasma Cortisol Levels in Protein-Calorie Malnutrition.
Arch. Dis. Childh. 43, 365-367 (1968)

57. REID, I.A., W.H. TU, K. OTSUKA, T.A. ASSAYKEEN and W.F. GANONG:
Studies Concerning the Regulation and Importance of Plasma Angiotensinogen Concentration in the Dog.
Endocrin. 93, 107-114 (1973)

58. REID, I.A.:
Effects of Angiotensin II and Glucocorticoids on Plasma Angiotensinogen Concentration in the Dog.
Am. J. Physiol. E 234-236 (1977)

59. REINBERG, A., M. APFELBAUM and R. ASSAN:
Chronophysiologic Effects of a Restricted Diet in Young Healthy But obese Woman.
Internat. J. Chronobiol. 1, 391-404 (1973)

60. ROMERO, J.C., J.D. LAZAR and S.W. HOOBLER:
Effects of Renal Artery Constriction and Subsequent Contralateral Nephrectomy on the Blood Pressure, Plasma Renin Activity and Plasma Renin Substrate Concentration in Rabbits.
Lab. Invest. 22, 581-587 (1970)

61. SCORNIK, O.A. and A.C. PALADINI:
Angiotensin Blood Levels in Hemorrhagic Hypotension and Other Related Conditions.
Am. J. Physiol. 206, 553-556 (1964)

62. SMITH, I.D. and W.J. SIMMONDS:
The Changes in Cardiac Output, Right Atrial Pressure and Blood Volume in Hemorrhagic Anaemias in Unanaesthetized Rabbits.
Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 32, 241-252 (1954)

63. STEIN, J.H., T.F. FERRIS:
The Physiology of Renin.
Arch. Intern. Med. 131, 860-871 (1973)

64. STEIN, M.:
Plasma-Renin bei Ratten unter verschiedenen Anaesthesiebedingungen.
Inaug. Diss. Würzburg (1975)

65. STRAUB, D.:
Methodische Probleme bei der Radioimmunologischen Renin-Bestimmung in menschlichem Plasma.
Inaug. Diss., Würzburg (1977)

66. TATEISHI, H., A. NASJLETTI and G.M.C. MASSON:
Role of Renin in the Regulation of Angiotensinogen Levels in Plasma.
Proc. Soc. Exp. Biol. 137, 1424-1428 (1971)

67. TEWKSBURY, D.A., M.R. PREMEAU and M.L. DUMAS:
Isolation of Human Angiotensinogen.
Biochim. Biophys. Acta 446, 87-95 (1976)

68. VANDER, A.J. and G.W. GEELHOED:
Inhibition of Renin Secretion By Angiotensin II.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 399-403 (1965)

69. WALKER, W.F., M.S. ZILELI, F.W. REUTTER, W.C. SHOEMAKER, D.FREIND and F.D. MOORE:
Adrenal Medullary Secretion in Hemorrhagic Shock.
Am. J. Physiol. 197, 773-780 (1959)

70. WALKER, W.F., W.C. SHOEMAKER, A.J. KAALSTAD and F.D. MOORE.
Influence of Blood Volume Restoration and Tissue Trauma on Corticosteroid Secretion in Dogs.
Am. J. Physiol. 197 (4), 781-785 (1959)

71. WEBER, M.A., I.R. THORNELL and G.S. STOKES:
Effects of Hemorrhage with and without Fluid Replacement on Plasma Renin Activity.
Am. J. Physiol. 225, 1161-1164 (1973)

72. WEIGAND, K., H. WERNZE and C. FALGE:
Synthesis of Angiotensinogen by Isolated Rat Liver Cells and its Regulation in Comparison to Serum Albumin.
Biochem. Biophys. Res. Communic. 75 (1977)

73. WERNZE, H., A. SEKI und H. MICHEL:
Veränderungen der Serum-Angiotensinogen Konzentration bei akuter Hepatitis und Leberzirrhose.
Klin. Wschr. 50, 53-55 (1972)

74. WERNZE, H., H.J. SPECH and G. MÜLLER:
Studies on the Activity of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) in Patients with Cirrhosis of the Liver.
Klin. Wschr. 56, 389-397 (1978)

75. ZAKHEIM, R.M., A. MOLTENI, L. MATTIOLO and M. PARK:
Plasma Angiotensin II Levels in Hypoxic and Hypovolemic Stress in Unaesthetized Rabbits.
J. Appl. Physiol. 41 (4), 462-465 (1976)

76. ZILELI, M.S., O. GEDIK, N. AKALAR and S. CAGLAR:
Adrenal Medullary Response to Removal of Various Amounts of Blood.
Endrocrinol. 95, 1477-1481 (1974)

Herrn Professor Dr. med. H. Wernze danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine eingehende Anleitung zum experimentellen und wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine kritischen aber zugleich konstruktiven Beiträge bei der Anfertigung der Dissertation.

Herrn Professor Dr. med. H.A. Kühn danke ich für die Übernahme des Korreferates und die mir gebotenen guten Arbeitsmöglichkeiten in seiner Klinik.

Allen Mitarbeitern des endokrinologischen Labors danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Einführung in die Methodik der radioimmunologischen Hormonbestimmung.

Herrn Präparator W. Kiesewetter, Tierlabor chirurgische Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Hilfestellung bei der Ausführung der operativen Eingriffe.

LEBENSLAUF

31.08.1950	geboren als viertes Kind von Albert und Wilhelmine Koch, geb. Mayer in Weißenburg/Bayern
15.09.1956 - 31.07.1959	Volksschule Weißenburg
15.09.1959 - 31.07.1960	Volksschule Margetshöchheim
15.09.1960 - 19.06.1971	Siebold-Gymnasium Würzburg Abitur
06.10.1971	Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
13.10.1972	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
02.04.1974	Ärztliche Vorprüfung
25.03.1975	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.10.1975 - 30.06.1976	Stipendium der französischen Regierung und Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Montpellier (Frankreich)
06.10.1976	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
17.03.1978	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07.06.1979	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15.06.1979	Heirat mit Brigitte Pötzl-Koch, geb. Pötzl
05.11.1979 - jetzt	Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundeswehr

Reinhard Koch